

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente - DAFNE*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLE PRODUZIONI
VEGETALI

CICLO: XXVI

**Regolazione epigenetica del meccanismo autonomo di fioritura in mais
(*Zea mays*)**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Berti

Supervisore: Ch.mo Prof. ssa Serena Varotto

Dottorando: Iride Mascheretti

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Una copia della tesi sarà disponibile presso
<http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Indice

Indice	3
Riassunto	8
Summary	10
Introduzione	12
1.1. L'importanza della fioritura	12
1.2. La regolazione della fioritura	13
1.2.1. La fisiologia del processo di fioritura nelle piante	13
1.2.2. La regolazione del <i>pathway</i> di fioritura in <i>Arabidopsis</i>	18
1.3. Meccanismi epigenetici e regolazione genica	20
1.3.1. La metilazione delle citosine	22
1.3.2. Nucleosomi e loro composizione	25
1.3.3. Modifiche istoniche	28
1.4. Il <i>pathway</i> autonomo e il <i>pathway</i> della vernalizzazione come vie per la regolazione epigenetica di <i>FLC</i> in <i>Arabidopsis</i>	32
1.4.1. Il <i>pathway</i> autonomo	32
1.4.2. La vernalizzazione	35
1.5. Il <i>pathway</i> del fotoperiodo: gli effetti della luce sulla transizione fiorale	37
1.6. Segnali ormonali che regolano la fioritura	38
1.7. Le proteine MSI	39
1.7.1. Le proteine MSI di <i>Arabidopsis</i> e di mammifero	40
1.7.2. FVE e gli elementi trasponibili	42
1.7.3. I geni <i>nfc101</i> e <i>nfc102</i> di mais	46

1.8. La regolazione della fioritura nelle principali piante di interesse agronomico	48
1.9. La regolazione della fioritura in mais	51
1.9.1. L'importanza del cereale <i>Zea mays</i>	51
1.9.2. Le origini tropicali del mais: cenni storici	52
1.9.3. Il progenitore del mais: implicazioni nella regolazione della fioritura	54
1.9.4. Segnali endogeni come indicatori dell'età della pianta	57
1.10. Geni di mais in grado di influenzare la transizione fiorale	59
1.10.1. I geni <i>ZMM4</i> e <i>ZMM15</i>	61
1.10.2. Il gene <i>DLF1</i>	62
1.10.3. Il gene <i>Id1</i>	63
1.10.4. Il putativo florigeno di mais, <i>ZCN8</i> e il suo putativo paralogo <i>ZCN7</i>	67
1.10.5. Regolazione di <i>ZCN8</i> mediata da <i>Id1</i>	71
1.11. Il segnale florigenico e la regolazione della fioritura: possibili applicazioni nel miglioramento genetico dei cereali	73
<i>Scopo e strategia sperimentale</i>	77
<i>Materiali e Metodi</i>	80
3.1. Genotipi utilizzati	80
3.1.1. Generazione delle linee transgeniche <i>nfc101/nfc102</i>	80
3.1.2. Alterazioni fenotipiche nei mutanti <i>nfc101/nfc102</i>	82
3.1.3. Mutanti <i>id1</i>	85
3.2. Condizioni di crescita delle piante e tessuti utilizzati per le analisi molecolari	85

3.3. Estrazione di RNA totale	88
3.4. Sintesi del cDNA	88
3.5. Reazioni di RT-PCR	92
3.6. Reazioni di real-time qRT-PCR	97
3.7. Saggi di estrazione e fissazione della cromatina da materiale fresco	99
3.8. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) da materiale fresco	100
3.9. Saggi di estrazione e fissazione della cromatina da materiale congelato	105
3.10. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) da materiale congelato	107
3.11. Saggi di northern blotting per l'analisi dei trascritti strand specific di <i>ZCN8</i>	111
3.12. Clonaggio del cDNA di <i>ZCN8</i> e di <i>ZCN7</i> prodotti dai rispettivi trascritti antisenso	112
Risultati	113
4.1. Strategia impiegata per analizzare i possibili target di <i>NFC101/NFC102</i>	113
4.2. Gli effetti della sotto-espressione di <i>nfc101/nfc102</i> sui geni coinvolti nella transizione fiorale di mais	114
4.2.1. In mais sembra non esistere un gene omologo a <i>AtFLC</i>	114
4.2.2. Il livello del trascritto del gene <i>DLF1</i> è inalterato nei mutanti <i>nfc101/nfc102</i>	119
4.2.3. L'espressione del gene <i>Id1</i> è negativamente	

regolata dalle proteine NFC101/NFC102	120
4.2.4 I geni <i>ZCN8</i> e <i>ZCN7</i> codificano per diverse tipologie di trascritti	126
4.2.5. Analisi dell'espressione di <i>ZCN8</i> e di <i>ZCN7</i> nei mutanti <i>nfc101/nfc102</i>	133
4.3. Meccanismi epigenetici mediati da Id1 e coinvolti nella regolazione dei florigeni di mais	139
4.3.1. Id1 regola positivamente la trascrizione di <i>ZCN8</i> e di <i>ZCN7</i>	139
4.3.2. L'azione di Id1 risulta associata alla variazione di modifiche della cromatina nei loci <i>ZCN8</i> e <i>ZCN7</i>	141
4.4. Effetti della down-regolazione dei geni <i>nfc101/nfc102</i> su alcuni elementi trasponibili	148
4.4.1. La sotto-espressione di <i>nfc101/nfc102</i> correla con la sovra-espressione di alcuni elementi trasponibili	148
Discussione	161
5.1. NFC101/NFC102 modulano l'espressione di regolatori della fioritura mediante modifiche della cromatina	161
5.2. La sotto-espressione de geni <i>nfc101/nfc102</i> non correla con un ritardo di durata della transizione fiorale	168
5.3. Meccanismi epigenetici nella regolazione dei florigeni mediata da id1	169
5.4. Coinvolgimento di NFC101/NFC102 nella regolazione trascrizionale dei TE	173
Bibliografia	178

Riassunto

Il meccanismo autonomo di fioritura regola la transizione dalla fase vegetativa alla fase riproduttiva in linee di mais temperato, indipendentemente da segnali ambientali. In *Arabidopsis*, è stato dimostrato che la regolazione epigenetica svolge un ruolo importante nel meccanismo autonomo di fioritura. Al fine di comprendere se la regolazione epigenetica è importante anche per la fioritura del mais, sono stati caratterizzati mutanti di epi-regolatori, che sono componenti del meccanismo autonomo di fioritura e mutanti di un regolatore chiave della transizione florale, per il quale è stata ipotizzata una funzione correlata a meccanismi epigenetici.

Relativamente al primo approccio, sono state analizzate linee che sotto-esprimono i geni *Nucleosome remodeling factor complex component 101 (nfc101)* e *nfc102*, due paraloghi codificanti per proteine *WD-repeat*, componenti di vari complessi che modificano la cromatina. I nostri risultati indicano che le proteine NFC101/NFC102 legano direttamente e reprimono l'espressione dei geni *Indeterminate1 (Id1)* e *Zea mays CENTRORADIALIS8 (ZCN8)*, regolatori chiave del meccanismo autonomo di fioritura. Le proteine NFC101/NFC102 legano anche le sequenze ripetute di diversi elementi trasponibili (TE), regolando negativamente e in modo tessuto-specifico gli RNA non-poliadenilati da loro prodotti. Nei mutanti *nfc101/nfc102*, tutti i *target* diretti di NFC101/NFC102 mostrano un profilo di modifiche istoniche caratterizzanti una cromatina trascrizionalmente attiva. La regolazione

mediata da NFC101/NFC102 coinvolge probabilmente meccanismi differenti, poiché esse reclutano la istone deacetilasi di tipo Rpd3 al gene *Id1* e ai TE, ma non al gene *ZCN8*. Nel complesso, questi risultati, insieme agli effetti pleiotropici osservati nei mutanti *nfc101/nfc102*, indicano che NFC101/NFC102, oltre a modulare l'espressione di regolatori della fioritura mediante modifiche della cromatina, sono coinvolti in molteplici meccanismi che controllano diversi aspetti dello sviluppo del mais.

Nel secondo approccio, è stato utilizzato il mutante nullo *id1*, per verificare se la sua azione di attivatore del florigeno *ZCN8* e del suo paralogo *ZCN7* viene svolta mediante regolazione epigenetica. I nostri risultati indicano che la funzione di *Id1*, espresso nella foglia immatura, correla solo parzialmente con la formazione, in questo tessuto, di un profilo di modifiche istoniche associate a una competenza trascrizionale nei *loci* dei florigeni, il cui mRNA processato è invece prodotto solo nella foglia matura. Pertanto, *Id1* potrebbe effettivamente promuovere nei florigeni la formazione di uno stato epigenetico “istruttivo” per la trascrizione, che è mantenuto durante lo sviluppo della foglia fino all'effettiva sintesi degli mRNA. Tuttavia, le osservazioni fatte suggeriscono che altri fattori sono richiesti per spiegare l'esistenza, nei florigeni, di un profilo di modifiche istoniche indipendente da *Id1*, così come l'importanza della regolazione post-trascrizionale che caratterizza la regolazione dei florigeni nella foglia matura nel mais.

Summary

In the B73 maize temperate line, the autonomous flowering *pathway* controls flowering independently of external signals. In *Arabidopsis*, the epigenetic mechanisms have been demonstrated to play an important role in the control of floral transition. To understand whether, also in maize, the epigenetic mechanisms are important in the regulation of flowering, we have characterized mutants in epiregulators that are components of the autonomous flowering *pathway*. Moreover, we have analyzed mutants in a key regulator of floral transition, for which a role in epigenetic mechanisms has been speculated. During the first approach, we have analyzed lines, which were simultaneously down-regulated in *nfc101* and *nfc102*. The maize *Nucleosome remodeling factor complex component101* (*nfc101*) and *nfc102* are putative paralogs encoding WD-repeat proteins with homology to plant and mammalian components of various chromatin modifying complexes. Our results indicate that the NFC101/NFC102 proteins directly bind and repress the *Indeterminate1* (*Id1*) and the *Zea mays CENTRORADIALIS8* (*ZCN8*) genes, two key regulators of the autonomous flowering *pathway*. In addition, the abolition of NFC101/NFC102 association with repetitive sequences of different transposable elements (TEs) resulted in tissue-specific up-regulation of non-polyadenylated RNAs produced by these regions. All direct NFC101/NFC102 targets showed histone modification patterns linked to active chromatin in *nfc101/nfc102* down-regulation lines. However,

different mechanisms may be involved because NFC101/NFC102 proteins mediate HDAC recruitment at *Id1* and TE repeats but not at *ZCN8*. These results, along with the pleiotropic effects observed in *nfc101/nfc102* down-regulation lines, suggest that NFC101 and NFC102 are components of distinct chromatin modifying complexes, which operate in different *pathways* and influence diverse aspects of maize development.

In the second strategy, we have analyzed *idl* mutants, to understand if Id1 is able to activate *ZCN8* and *ZCN7* expression through epigenetic mechanisms. We have demonstrated that *Id1*, which is expressed in the immature leaf, partially contributes to the formation of histone modification patterns linked to active chromatin in the *ZCN8* and *ZCN7* loci in this tissue. So, in the immature leaf Id1 could be important for the formation of active chromatin at the *ZCN8* and *ZCN7* loci, which is maintained through mitotic divisions until the formation of mature leaf, where *ZCN8* and *ZCN7* are expressed. However, our results also indicate that other proteins could play a role in the formation of active chromatin at the *ZCN8* and *ZCN7* genes, independently from Id1 and could be necessary in the post-transcriptional regulation of *ZCN8* and *ZCN7*.

Introduzione

1.1. L'importanza della fioritura

Il ciclo vitale delle piante da fiore consiste di una fase vegetativa, durante la quale la pianta aumenta la sua biomassa, e di una fase riproduttiva, nella quale le risorse accumulate durante la fase vegetativa sono utilizzate per la formazione degli organi fiorali, per la fecondazione e per il successivo sviluppo del seme (Figura 1).

La transizione tra queste due fasi, definito momento di fioritura, è un processo critico per la pianta, poiché da esso dipende il successo riproduttivo della pianta stessa e, nel caso ad esempio dei cereali, il rendimento in termini di qualità e di quantità di seme prodotto.

Affinché la fioritura avvenga nel periodo ottimale durante il ciclo vitale di una pianta, è necessaria una corretta sincronia tra le condizioni ambientali esterne e le risorse endogene della pianta stessa. Tale interazione consente alla pianta di evitare, ad esempio, la fioritura durante un periodo di siccità che causerebbe inevitabilmente una fecondazione abortiva.

Comprendere il meccanismo che regola la fioritura è, pertanto, di fondamentale importanza per la comprensione dei processi di adattamento delle piante alle differenti condizioni ambientali. Inoltre, poiché esiste un legame diretto tra fioritura e produttività di una pianta, la conoscenza di tali processi ha importanti implicazioni anche nel settore agricolo e, in particolare, nel miglioramento genetico per la produttività di molte *piante coltivate*.

1.2. La regolazione della fioritura

1.2.1. La fisiologia del processo di fioritura nelle piante

La transizione fiorale, definita come il passaggio dalla fase vegetativa alla fase riproduttiva nel ciclo vitale di una pianta, è un processo raramente reversibile, che determina il successo riproduttivo della pianta stessa. Per tale motivo, esso è coordinato da un complesso sistema di meccanismi regolatori che ne determinano il compimento in un momento definito ottimale per la fecondazione e per il successivo sviluppo del seme (Putterill *et al.*, 2004; Figura 1).

Analisi genetiche e fisiologiche del processo di fioritura hanno evidenziato come esso sia fortemente influenzato sia da fattori ambientali esterni, come temperatura e fotoperiodo, sia da segnali endogeni, come i livelli di zuccheri e ormoni (Huijser e Schmid, 2011).

In definitiva, tutti questi segnali convergono per regolare la crescita del meristema apicale (SAM, *shoot apical meristem*), che viene convertito dapprima in meristema dell'infiorescenza (IM) e in ultimo, in meristema fiorale (FM).

Oltre ad essere fondamentale per il successo riproduttivo della pianta, il controllo della transizione fiorale ha anche un'importante implicazione agronomica. Per esempio, la fioritura prematura porta a una riduzione della biomassa della pianta e a scarso numero di semi prodotti. Similarmente, il prolungamento della fase vegetativa è associato con aumento della biomassa, ma parallelamente, alla produzione di un numero ridotto di semi.

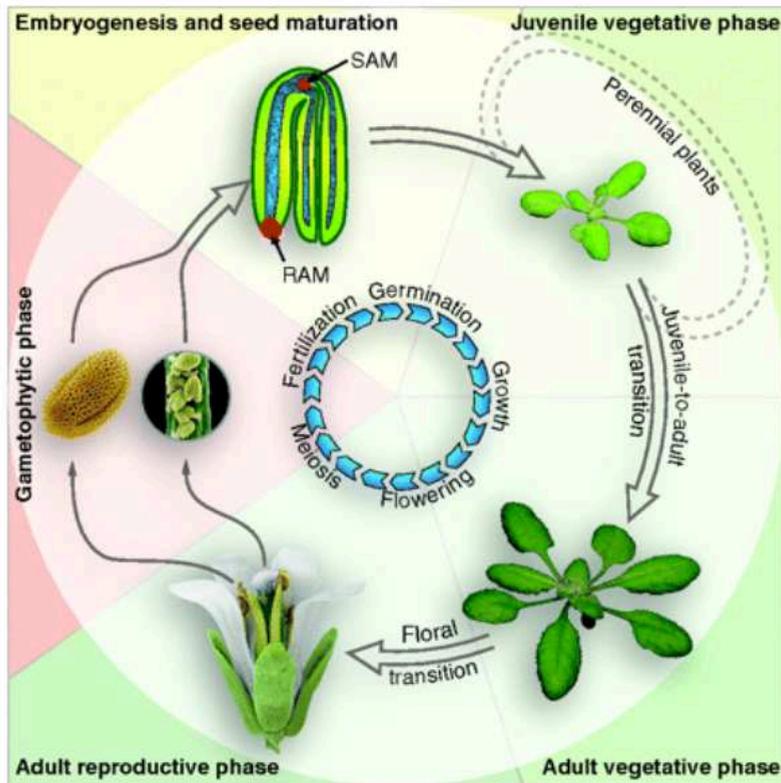


Figura 1 – Fasi dello sviluppo di una pianta. Le piante attraversano una serie di fasi durante il loro ciclo vitale. Durante la riproduzione sessuale vengono prodotti i gameti (fase gametofitica). In seguito alla fecondazione viene stabilita una popolazione di cellule meristematiche, che danno origine al RAM e al SAM. Da questi meristemi si originano tutti gli organi post-embrionali. L'intera parte aerea della pianta si origina dal SAM. Dopo la germinazione le piante attraversano generalmente tre fasi. Durante la prima fase vegetativa, la pianta aumenta in dimensione e in biomassa. La crescita vegetativa può essere suddivisa in fase giovanile e in fase adulta. In seguito, le piante acquisiscono la competenza a fiorire (fase adulta). Durante questa fase, le piante sviluppano l'infiorescenza, producono i gametofiti maschile e femminile aploidi contenenti i gameti che si fondono a formare lo zigote (inizio della fase sporofitica) (tratto da Huijser e Schmid, 2011).

La differenza principale tra le monocotiledoni, come *Zea mays*, e le dicotiledoni, come *Arabidopsis thaliana*, è nel numero di cotiledoni, simili a delle foglioline embrionali presenti nel seme (Figura 2).

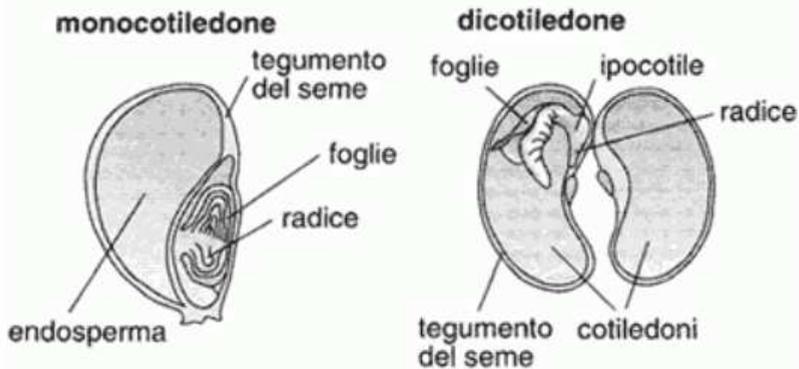


Figura 2 – Differenze tra i semi di monocotiledoni e dicotiledoni.

I cotiledoni, in particolare nelle dicotiledoni, hanno la funzione di riserva e di nutrimento dell'embrione dall'inizio della germinazione al momento in cui si sviluppano la radice e le prime foglie, stadio in cui l'individuo è in grado di compiere la fotosintesi e, quindi, di nutrirsi autonomamente.

Nel mais, invece, le riserve per la germinazione sono principalmente extra-embryonali, trovandosi nell'endosperma del seme. In questo caso, l'unico cotiledone, detto scutello, svolge funzione austoriale, cioè assorbe le sostanze nutrienti dall'endosperma per renderle disponibili all'embrione.

Diversamente dagli animali, le piante possiedono delle regioni caratterizzate da cellule che conservano la capacità di dividersi per moltissimo tempo e, in molti casi, per tutta la vita della pianta. Tali tessuti, definiti meristema apicale (SAM), struttura che darà origine al fusto, alle foglie e alle gemme laterali della pianta, e meristema radicale (RAM), responsabile della formazione delle radici, vengono definiti durante l'embriogenesi zigotica.

Nello sviluppo post embrionale, la struttura architettonica della parte aerea della pianta è, invece, principalmente determinata dall'attività del meristema apicale e del meristema ascellare (AM), che origina dal SAM e si forma alle ascelle delle foglie.

Le cellule staminali del SAM sono localizzate nella regione superiore della zona centrale del meristema (CZ), nella quale le cellule si dividono molto lentamente. La progenie cellulare che ne deriva, da un lato rifornisce continuamente il meristema di cellule staminali, dall'altro viene dislocata nella zona periferica (PZ), nella quale le cellule cominciano a dividersi molto più rapidamente originando gli organi laterali.

La transizione verso la fioritura di una pianta implica cambiamenti radicali nel destino delle cellule dei meristemi apicali. L'insieme degli eventi che porta il meristema apicale a produrre il fiore viene indicato come induzione fiorale.

Durante la fase vegetativa, il SAM è caratterizzato da una forma detta a cupola. Durante la transizione fiorale, processo molto rapido che richiede solo qualche giorno, il SAM comincia ad allungarsi e a sviluppare una serie di meristemi superiori che culminano nella

formazione dell'infiorescenza maschile (McSteen *et al.*, 2000; Figura 3).

In seguito a questo evento, il meristema vegetativo passa dalla produzione di foglie e primordi ascellari alla produzione di un numero indeterminato di primordi fiorali. Il meristema apicale che si viene a formare prende il nome di meristema dell'infiorescenza, ai cui lati si trova un gruppo di cellule che definisce il meristema florale. Il meristema dell'infiorescenza, caratterizzato da cellule in crescita continua, costituisce una fase di transizione tra la fase vegetativa e la fase riproduttiva nel ciclo vitale di una pianta (Figura 3).

Poiché il meristema apicale della pianta di mais non produce altre foglie una volta che è cominciata la transizione florale, il numero totale di foglie prodotte durante la fase vegetativa è un indicatore quantitativo del momento di fioritura.

Nel 1936, lo scienziato Russo-Armeno Mikhail Chailakhyan propose l'esistenza di un segnale vegetale universale responsabile dei cambiamenti morfologici che si osservano nel meristema apicale durante la transizione florale. Tale segnale, in seguito denominato *florigeno* (flower former) dallo stesso Chailakhyan, sarebbe originato nelle foglie e trasferito al SAM mediante il floema (Chailakhyan, 1936).

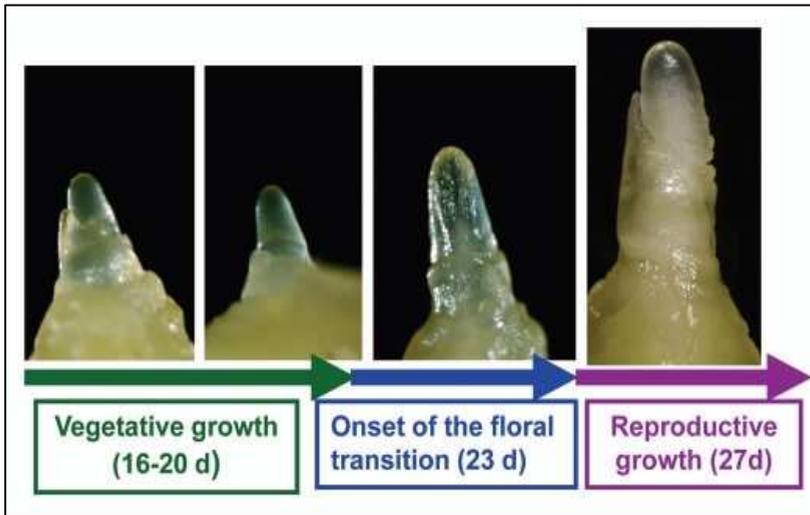


Figura 3 – Cambiamenti morfologici del meristema apicale durante la transizione fiorale nella linea *inbred* B73 di mais (tratto da Danilevskaya *et al.*, 2011).

1.2.2. La regolazione del *pathway* di fioritura in *Arabidopsis*

La comprensione della gran parte dei meccanismi molecolari e genetici che regolano la fioritura è stata resa possibile dagli studi effettuati sulla pianta modello *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), una piccola pianta della famiglia delle Brassicacea, per la quale sono disponibili vaste risorse genetiche.

È interessante ricordare che il primo mutante di *Arabidopsis* fu identificato da Alexander Braun nel 1873. Il gene coinvolto fu clonato nel 1990 ed è noto con il nome di *AGAMOUS*, gene omeotico floreale (Yanofsky *et al.*, 1990).

Numerose analisi genetiche in *Arabidopsis* hanno permesso di identificare molti dei geni coinvolti nel *pathway* di fioritura (Mouradov *et al.*, 2002; Simpson e Dean, 2002; Putterill *et al.*, 2004).

Il risultato di questi studi consiste in un modello nel quale differenti meccanismi regolano l'espressione di pochi geni chiave noti come *integratori del segnale di fioritura* e la cui funzione principale è la regolazione dell'espressione di geni coinvolti nell'identità del meristema apicale (*floral identity genes*) (Kardailsky *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2005).

Mediante l'analisi del fenotipo di mutanti nel *pathway* di fioritura cresciuti in diverse condizioni ambientali, sono stati caratterizzati cinque *pathway* parzialmente indipendenti l'uno dall'altro: il *pathway* autonomo, il *pathway* della vernalizzazione, il *pathway* del fotoperiodo, il *pathway* della qualità della luce e il *pathway* delle giberelline (Ausin *et al.*, 2005; Boss *et al.*, 2004; Figura 4).

Il *pathway* autonomo e il *pathway* della vernalizzazione, nello specifico, agiscono reprimendo l'espressione di *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, il principale repressore della transizione fiorale in *Arabidopsis*, per il quale è stata dimostrata l'esistenza di una regolazione di tipo epigenetico (Ausin *et al.*, 2005).

I diversi meccanismi coinvolti nel *pathway* di fioritura sono descritti nel dettaglio in seguito.

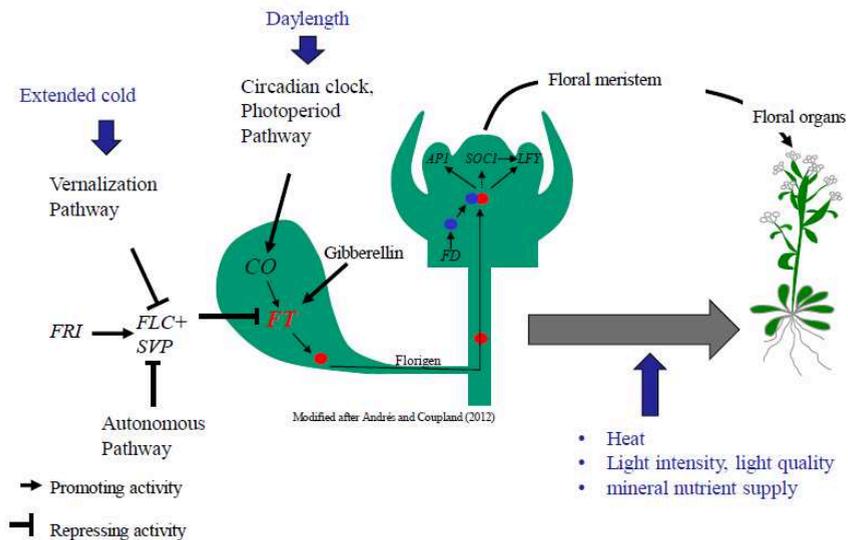


Figura 4 – Schema dei principali fattori ambientali e genetici coinvolti nel *pathway* di fioritura di *Arabidopsis* (tratto da Christian Jung, *genomics assisted breeding workshop*, San Diego, 15/01/2013).

1.3. Meccanismi epigenetici e regolazione genica

Il primo modello di regolazione genica in procarioti fu proposto da Francois Jacob e Jaques Monod che valse loro il premio Nobel per la Medicina nel 1965. Essi dimostrarono che i geni sono controllati a livello trascrizionale dal prodotto di altri geni codificanti dei regolatori che agiscono legando specifici siti nel DNA situati in prossimità della regione che controllano. Diversi anni dopo si è scoperto che queste proteine regolative riescono a reprimere o ad attivare la trascrizione (Englesberg *et al.*, 1965; Gilbert e Hill, 1966; Ptashne, 1967)

Tale concezione è applicabile anche agli eucarioti, ma in questo caso è necessario considerare che il DNA è impacchettato attorno ad un

complesso proteico istonico, a costituire il nucleosoma, che rappresenta l'unità di base della cromatina (Farrona *et al.*, 2008).

Normalmente la cromatina rappresenta una barriera fisica che impedisce ai fattori di trascrizione, siano essi attivatori o repressori, di accedere liberamente alla sequenza del DNA per regolarne la trascrizione. Pertanto, i fattori in grado di modificare la struttura o la composizione della cromatina svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione genica (Lauria e Rossi, 2011). Tali fattori sono spesso catalogati come regolatori epigenetici, poichè modulano l'attività di un gene senza alterare la sequenza della doppia elica del DNA. Tuttavia, un meccanismo regolativo può essere definito di tipo epigenetico solo se le modifiche della struttura della cromatina non sono transitorie, ma vengono mantenute nel corso di almeno una replicazione del DNA, che avviene nelle divisioni mitotiche o nelle divisioni meiotiche (Roudier *et al.*, 2011).

Da quanto detto, risulta evidente che i meccanismi epigenetici, che rispondono a stimoli ambientali o endogeni, determinano la "formazione" di un nuovo tipo di variabilità, la variabilità epigenetica, che affianca quella di tipo genetico nei processi evolutivi degli organismi viventi. Entrambe le variabilità, inoltre, possono essere esplorate e sfruttate nei processi utilizzati dall'uomo per ottenere, ad esempio, un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni agronomiche (Cortijo *et al.*, 2014). Infine, poiché tutto il genoma è "impacchettato" nella cromatina, ne risulta che la regolazione epigenetica opera in tutti i processi biologici che hanno il DNA come

substrato e regola l'espressione di tutti i geni, inclusi quelli coinvolti nel processo di fioritura.

Di seguito saranno analizzati in dettaglio le diverse tipologie di regolazione epigenetica.

1.3.1. La metilazione delle citosine

La metilazione delle citosine prevede l'aggiunta di un gruppo metile alla base nucleotidica citosina ad opera dell'enzima metil-transferasi, con la formazione di una 5-metilcitosina (Figura 5).

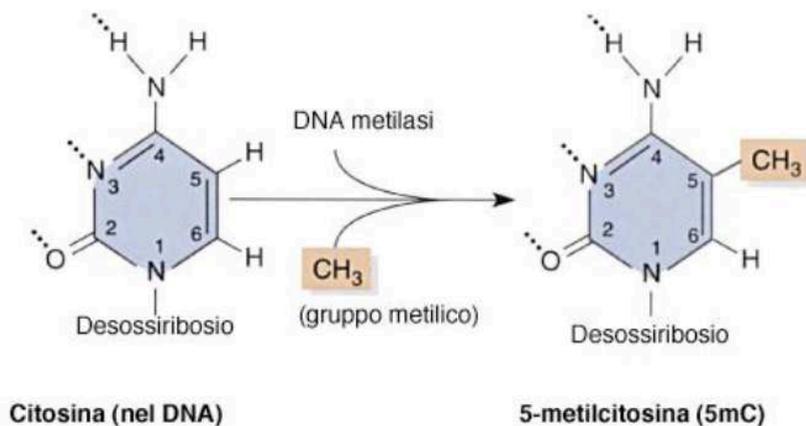


Figura 5 – Formazione della 5-metilcitosina ad opera dell'enzima DNA metilasi.

Nelle piante superiori, la metilazione delle citosine può avvenire in tre contesti differenti: CG, CHG e CHH (dove H significa qualsiasi base azotata eccetto la citosina) (Henderson e Jacobsen, 2007).

La metilazione a livello di CG e CHG è mantenuta a seguito della mitosi rispettivamente mediante la DNA METILTRANSFERASI1 (MET1) e la CROMOMETILASI 3 (CMT3). La metilazione a livello di CHH viene stabilita *de novo* dalla DNA metiltransferasi DOMAINS-REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2), che agisce nel *pathway* RNA-DEPENDENT DNA METHYLATION (RdDM) (Law e Jacobsen, 2010).

Il *pathway* RdDM è un meccanismo attraverso il quale gli short interfering RNA (siRNAs), usualmente prodotti da sequenze ripetute, come gli elementi trasponibili (TEs), dirigono la metilazione *de novo* delle sequenze di DNA a loro complementari in tutti e tre i contesti di sequenza. Specificamente, studi effettuati principalmente in *Arabidopsis* hanno evidenziato che la RNA polimerasi IV (Pol IV), specifica delle piante, genera trascritti di RNA a singolo filamento, successivamente convertiti in molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs) da RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE2 (RDR2). I dsRNAs vengono, quindi, processati da *DICER 3 (DCL3)* per produrre molecole di siRNAs di 24 nucleotidi, le quali vengono caricate nel complesso *RISC (RNA-INDUCED SILENCING COMPLEX)*, contenente la proteina ARGONAUTE 4 (AGO4). Gli siRNAs sono in grado di interagire con trascritti non poliadenilati e non codificanti (lncRNAs) generati dall'RNA polimerasi V (Pol V) utilizzando come template lo stesso DNA usato da Pol IV (Wierzbicki *et al.*, 2009). Ne deriva che gli siRNA vengono veicolati verso la sequenza di DNA dalla quale sono stati prodotti e verso la quale mostrano complementarità. Il risultato è il reclutamento, mediante

meccanismi non ancora completamente elucidati, di un complesso multi-proteico che contiene, tra gli altri, DRM2 e altri epi-regolatori che modificano gli istoni, come le istone deacetilasi (HADC), le istone metiltransferasi (HMT) che favoriscono la dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9me2) e altri ancora. Questo complesso funziona da effettore del *pathway* RdDM perché determina la metilazione *de novo* delle citosine ai loci target, portando alla formazione di eterocromatina e al successivo silenziamento genico (Matzke *et al.*, 2009; Chinnusamy e Zhu, 2009; Bernatavichute *et al.*, 2008).

In *Arabidopsis*, è stato osservato che la metilazione delle citosine è più frequente nelle regioni ripetute e nei TE, dove la percentuale di metilazione delle citosine arriva a superare il 90% (Zhang *et al.*, 2006). I geni sono maggiormente metilati in sequenze CG, principalmente a livello della regione trascritta codificante, definita corpo del gene (*gene body*) (Zhang *et al.*, 2006). La metilazione delle citosine può riguardare anche la regione del promotore e in tal caso essa risulta spesso associata a una repressione di trascrizione perché un alto livello di metilazione nelle citosine del promotore correla con lo stabilirsi di una cromatina meno accessibile ai fattori di trascrizione (Zilberman *et al.*, 2007).

La metilazione del DNA in contesti non-CG è stata a lungo considerata pianta-specifica. Recenti analisi del metiloma hanno, tuttavia, dimostrato che anche i mammiferi utilizzano, sebbene in misura minore, tale marchio epigenetico: la metilazione non-CG è, ad esempio, parte di un meccanismo che mantiene le cellule staminali embrionali in stato di pluripotenza. Tale osservazione contrasta con

quanto accade nelle piante, dove la metilazione non-CG è prevalentemente limitata ai TE in tutti i tessuti e non solo nelle cellule staminali embrionali indifferenziate (Feng *et al.*, 2010).

1.3.2. Nucleosomi e loro composizione

Negli organismi eucariotici, il DNA è associato a dei complessi proteici che svolgono un ruolo strutturale nell'organizzazione del doppio filamento di DNA nei cromosomi. Tali proteine sono chiamate istoni e sono altamente conservate in tutti gli organismi (Pasqua *et al.*, 2008). Essi sono costituiti principalmente da aminoacidi con carica positiva (lisina e arginina), per favorire il legame al DNA, che ha carica complessiva negativa .

L'insieme del DNA associato a queste proteine prende il nome di cromatina, la cui unità di base, è definita nucleosoma (Luger, 2003). Un nucleosoma è composto da un tratto di DNA di 147 bp avvolto attorno a un ottamero istonico, formato da due molecole di ciascun istone H2A, H2B, H3 e H4 (Luger *et al.*, 1997; Thiriet e Hayes, 2006; Figura 6). I nucleosomi sono intervallati da un tratto di DNA denominato linker, la cui lunghezza varia generalmente tra le 20 e le 80 paia di basi (bp).

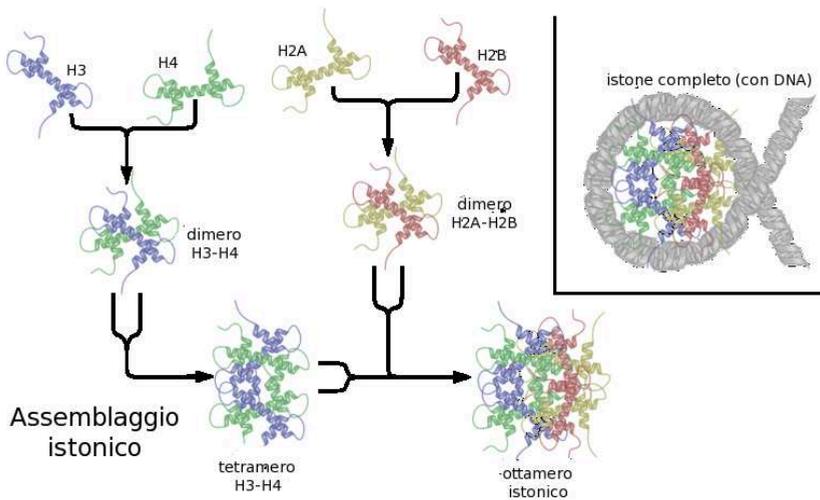


Figura 6 – Rappresentazione schematica dell’assemblaggio degli istoni e del loro legame al DNA. Inizialmente le proteine H3 e H4 formano un dimero, così come le proteine H2A e H2B. Successivamente, altri due dimeri si uniscono formando dei tetrameri, che solo in ultimo origineranno l’ottamero istonico che legherà il DNA (tratto da Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2011).

L’insieme dei nucleosomi detta una prima struttura organizzativa e riduce la lunghezza del DNA di circa sei volte, formando la cosiddetta “fibra da 10 nm”. Tale struttura, nota anche con il nome di “collana di perle” è un primo livello di condensazione, ancora insufficiente, poiché il DNA così impacchettato è 60000 volte più lungo del diametro del nucleo.

Il secondo livello di compattazione prevede l’entrata in funzione dell’istone H1, che accorpa i nucleosomi sovrapponendoli a due a due (fibra cromatinica) o raggruppandoli in gruppi di otto ciascuno (solenioide). Tale struttura può contorcersi su di sé formando anse e

controanse, accorciandosi di oltre dieci volte. Questo livello di condensazione è chiamato eucromatina ed è il grado di organizzazione che la cellula mantiene nel suo DNA durante la trascrizione attiva, oppure a livello di quei geni che sono normalmente espressi durante le varie fasi dello sviluppo.

Durante il differenziamento, parte della cromatina viene ulteriormente condensata, per impedirne la trascrizione: avviene così il quarto livello di condensazione, scoperto in prossimità delle estremità telomeriche e nei pressi del centromero dei cromosomi, dove la cromatina è sempre molto condensata a prescindere dal tipo cellulare e contiene pochissimi geni. Tale livello di condensazione è definito eterocromatina.

La cromatina è una struttura altamente dinamica, coinvolta nella regolazione delle funzioni cellulari. La dinamicità di tale struttura è regolata da numerosi complessi multi-proteici, la maggior parte dei quali aventi funzione enzimatica in grado di modificare la struttura degli istoni e di rimodellare la cromatina mediante l'utilizzo di adenosina tri-fosfato (ATP), complessi di rimodellamento detti ATP-dipendenti (Lewin *et al.*, 2010).

Particolari complessi sono, inoltre, in grado di inserire nella cromatina istoni non canonici, dotati di modifiche strutturali in grado di alterare il livello di condensazione della cromatina stessa. Un esempio è costituito dall'istone H2A.Z, assente nelle regioni cromatiniche più condensate e promotore della trascrizione (Pasqua *et al.*, 2011; Figura 7).

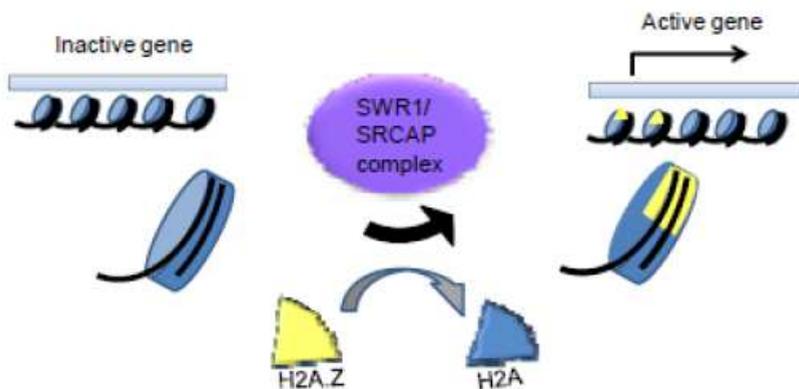


Figura 7 – La variante istonica H2A.Z promuove la trascrizione di segmenti di DNA normalmente non accessibili (tratto da *American Society of Plant Biologist*, 2010).

1.3.3. Modifiche istoniche

Una delle regolazioni epigenetiche più studiate sono le modifiche alle code istoniche. Le più comuni sono l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione.

Con l'eccezione della metilazione, queste modifiche mirano a modificare la carica elettrostatica degli istoni al fine di alterare il legame con il DNA e con gli altri istoni. Esse agiscono, inoltre, da richiamo per complessi proteici coinvolti nel rimodellamento della cromatina o con i fattori di trascrizione, che regolano l'accesso del DNA alla RNA polimerasi II (PolII) e a diversi fattori di trascrizione. Specifici domini strutturali, chiamati bromodomini e cromodomini, mediano le interazioni tra gli enzimi che modificano gli istoni e altri regolatori. Il bromodominio, in particolare, è presente in proteine che legano le code acetilate degli istoni, mentre proteine caratterizzate dal

cromodominio interagiscono con le code metilate degli istoni. Inoltre, molte proteine contenenti il bromodominio possiedono attività acetiltransferasica (HAT) e agiscono specificatamente sulle code istoniche. Uno degli esempi classici di modifiche istoniche consiste appunto nell'acetilazione degli istoni: le code istoniche possiedono dei residui di lisina, ai quali possono essere legati dei gruppi acetili, che, privando il DNA di una carica positiva, allentano il legame dei nucleosomi al DNA, decondensandolo e promuovendo uno stato trascrizionalmente attivo (Figura 8).

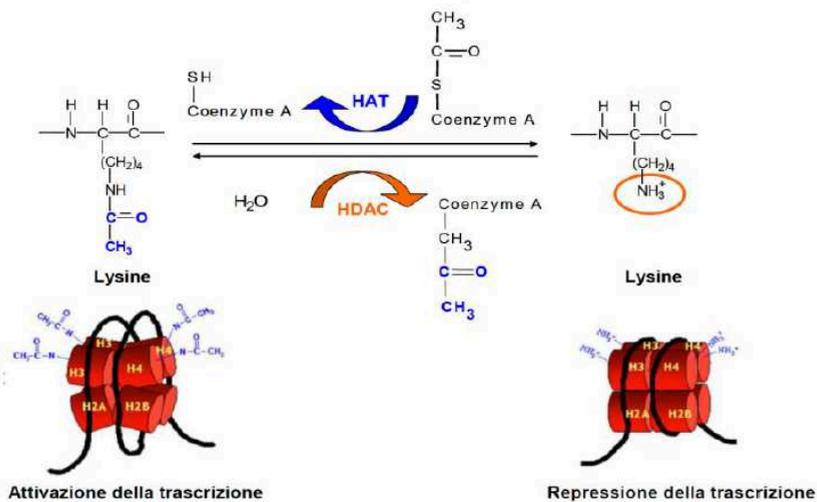


Figura 8 – Schematizzazione del processo di acetilazione/deacetilazione istonica ad opera di complessi enzimatici ATP-dipendenti. L'effetto sulla struttura cromatinica è rappresentato graficamente.

Le modifiche post-trascrizionali (PTM) degli istoni possono essere studiate mediante saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con anticorpi specifici per la modifica istonica in esame.

Analisi condotte sull'intero genoma, insieme ad esperimenti di ChIP-chip (cromatina immunoprecipitata ibridata su microarray) e ad esperimenti di ChIP-seq (sequenziamento ad elevata risoluzione di cromatina immunoprecipitata) hanno dimostrato che l'acetilazione della lisina in posizione 9 dell'istone H3 (H3K9ac) e l'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27ac) si localizzano quasi esclusivamente nei geni e correlano con l'attivazione trascrizionale, depositandosi preferibilmente all'estremità 5'-terminale dei geni e, in particolar modo, in corrispondenza del sito di inizio della trascrizione (TSS) (Lauria e Rossi, 2011).

Al contrario dell'acetilazione, che riguarda specificamente i residui di lisina, la metilazione degli istoni può avvenire sia sui residui di lisina che di arginina e differisce in base al numero di gruppi metili aggiunti (Kouzarides, 2007). È stato osservato che la tri-metilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me3) e la di- e tri-metilazione della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36me2 e H3K36me3) sono abbondanti nei geni altamente espressi (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Schübeler *et al.*, 2004). Tali modifiche istoniche sono, tuttavia, differenzialmente distribuite, poiché H3K4me3 è localizzata prevalentemente a livello del promotore e dell'estremità 5'-terminale dei geni, mentre H3K36me2 e H3K36me3 si localizzano a livello della regione genica trascritta (Lauria e Rossi, 2011).

Anche la mono- e di-metilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me1 e H3K4me2) sono marchi genici specifici. La loro distribuzione, tuttavia, non correla positivamente con il livello di trascrizione dei geni. Inoltre, H3K4me1 tende ad accumularsi preferibilmente nel corpo del gene, mentre H3K4me2 si localizza a livello del promotore e dell'estremità 5'-terminale, sebbene più a valle rispetto alla localizzazione di H3K4me3 (Lauria e Rossi, 2011; Zhang *et al.*, 2009).

Un'altra modifica istonica che caratterizza preferibilmente i geni, ma con una funzione completamente opposta a quella dei marchi appena descritti, è la tri-metilazione della lisina in posizione 27 dell'istone H3 (H3K27me3). Tale marchio caratterizza prevalentemente i geni regolati in maniera tessuto-specifica ed espressi differenzialmente durante lo sviluppo (Lauria e Rossi, 2011).

Il marchio eterocromatinico per eccellenza, H3K9me2, è stato ritrovato in un numero limitato di geni repressi di *Arabidopsis*, localizzato tra il promotore ed il corpo del gene (Saze e Kakutani, 2010).

Concludendo, gli studi effettuati sull'analisi delle modifiche istoniche in diversi organismi hanno dimostrato che lo stato trascrizionale di un gene è molto spesso correlato, non ad una, bensì ad una serie di modifiche istoniche.

1.4. Il *pathway* autonomo e il *pathway* della vernalizzazione come vie per la regolazione epigenetica di *FLC* in *Arabidopsis*

Il *pathway* autonomo e il *pathway* della vernalizzazione comprendono una serie di geni impiegati nella regolazione della fioritura in *Arabidopsis*, che, mediante meccanismi epigenetici, riescono a silenziare il gene *FLC*, definito come il regolatore negativo chiave dell'induzione a fiore (Pasqua *et al.*, 2011). *FLC* codifica per un fattore trascrizionale di tipo MADS-box, in grado di reprimere la fioritura interferendo direttamente con l'espressione del florigeno *FLOWERING LOCUS T (FT)* nella foglia e con l'espressione di *FLOWERING LOCUS D (FD)* nel meristema apicale (Searle *et al.*, 2006).

1.4.1. Il *pathway* autonomo

In *Arabidopsis*, sono stati identificati sette geni coinvolti nel *pathway* autonomo di fioritura: *FCA*, *FLD*, *FPA*, *FVE*, *FY*, *LD* E *FLD* (Simpson, 2004; Figura 9). Tali geni non agiscono in maniera gerarchica all'interno del *pathway*, ma cooperano nella repressione dell'espressione di *FLC* mediante meccanismi epigenetici, quali il rimodellamento della cromatina e processi di metilazione del DNA mediati da RNA (Veley e Michaels, 2008; He, 2009; Amasino, 2010). *FCA*, *FPA* e *FLK* sono caratterizzati da domini RRM (*RNA recognition motif*) che suggeriscono un loro probabile coinvolgimento nella modificazione post-trascrizionale dei targets (Lim *et al.*, 2004; Macknight *et al.*, 1997; Schomburg *et al.*, 2001).

FY codifica per una proteina partner di *FCA* ed è coinvolta nel processamento dell'estremità 3'-terminale degli RNA messaggeri (Simpson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010).

Il gene *LD* codifica per una proteina contenente un omeodominio che si lega a *SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 (SUF4)*, prevenendo la sua azione promotrice nei confronti del gene *FLC* (Kim *et al.*, 2006).

FLD codifica per una istone demetilasi che ha come substrato H3K4me3 e H3K4me2 (Simpson, 2004), mentre *FVE* codifica per una proteina della classe WD-repeat che è presente in molti complessi multi-proteici in grado di modificare la cromatina (vedere successivamente) (Simpson, 2004).

Sia *FLD* che *FVE* possono essere componenti di un comune complesso multi-proteico, che contiene anche istone deacetilasi (HDAC) del tipo Rpd3 (*REDUCED POTASSIUM DEFICIENCY 3*) (Figura 10), che enzimi coinvolti nella repressione dell'espressione genica mediante la rimozione di gruppi acetilati dai residui istonici (Ausin *et al.*, 2004; He *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Nei mutanti *fld* e *fve* di *Arabidopsis* si assiste, infatti, a un aumento dei livelli di acetilazione in corrispondenza del locus *FLC*, indicando che il complesso contenente *FLD*, *FVE* e HDACs è coinvolto nella repressione di *FLC* (He H *et al.*, 2003; He Y *et al.*, 2003; Ausin *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). Inoltre, tale complesso agisce in collaborazione con il complesso *PRC2* (POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX2) coinvolto nella deposizione di marchi istonici di tipo repressivo H3K27me3 al locus di *FLC* (Gu *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2002; Figura 10). Nei mutanti *fve*, si osserva, infatti, una diminuzione del marchio

istonico H3K27me3 a livello della cromatina di *FLC* (Bouveret *et al.*, 2006).

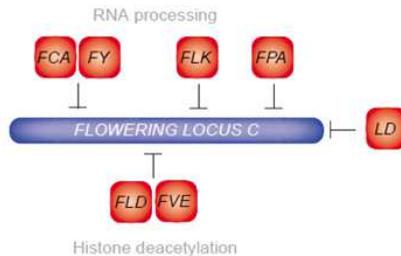


Figura 9 – Schema dei principali geni che agiscono sulla repressione di *FLC* nel *pathway* autonomo di fioritura di *Arabidopsis* (tratto e adattato da Ausìn *et al.*, 2005).

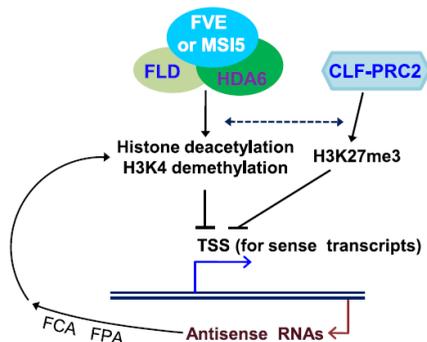


Figura 10. Rappresentazione schematica del meccanismo di silenziamento cromatinico al locus *FLC* in *Arabidopsis*. La formazione del trascritto antisenso di *FLC* (da parte di *FCA* e *FPA*) favorisce il reclutamento di complessi deputati alla deposizione di marchi istonici repressivi al locus di *FLC*. Il complesso *FVE-MSI5/HDA6/FLD* causa da un lato deacetilazione degli istoni e demetilazione di *H3K4*; dall'altro collabora con il complesso *PRC2* nella deposizione di *K27me3* sugli istoni *H3*. Tali modificazioni comportano la formazione di uno status cromatinico repressivo al locus *FLC* e conseguente repressione della trascrizione (tratto da Gu *et al.*, 2011).

1.4.2. La vernalizzazione

Molte specie vegetali, tipiche dei climi temperati, richiedono l'esposizione alle basse temperature invernali per la successiva fioritura primaverile. Tale processo, noto con il nome di vernalizzazione (Chouard, 1960; Henderson e Dean, 2004), è stato studiato utilizzando *Arabidopsis* come sistema modello. Negli ecotipi di *Arabidopsis* sensibili alla vernalizzazione, l'espressione di *FLC* è ridotta in seguito a lunghe esposizioni a basse temperature che comportano stabili cambiamenti nella sua struttura cromatinica (Sheldon *et al.*, 2000).

In *Arabidopsis*, la repressione di *FLC* mediata dalla vernalizzazione mostra molte caratteristiche ben conservate che rendono questo processo uno degli esempi di regolazione epigenetica meglio studiati. L'esposizione prolungata al freddo stabilisce, infatti, uno stato cromatinico stabile che viene mantenuto nel corso delle successive divisioni mitotiche (Burn *et al.*, 1993), ma che viene resettato ad ogni generazione, così che l'esposizione al freddo sia un evento necessario per la fioritura in ciascuna generazione di piante (Choi *et al.*, 2009; Sheldon *et al.*, 2008).

La repressione epigenetica indotta dalla vernalizzazione riguarda esclusivamente il locus *FLC*, poiché i geni adiacenti a *FLC*, sebbene influenzati dal freddo, non sono in grado di stabilire una "memoria" di questo evento (Sheldon *et al.*, 2009). Esiste, inoltre, una netta separazione temporale tra l'inizio (durante l'esposizione al freddo) e il mantenimento (in seguito all'esposizione al freddo) del processo di silenziamento di *FLC* (Sheldon *et al.*, 2009).

Con l'esposizione al freddo, la trascrizione di *FLC* diminuisce rapidamente. Questo fenomeno risulta, almeno in parte, correlato alla sovra-espressione di un trascritto antisenso non-codificante, denominato *COOLAIR*, prodotto dallo stesso locus *FLC* (Swiezewski *et al.*, 2009; Figura 11).

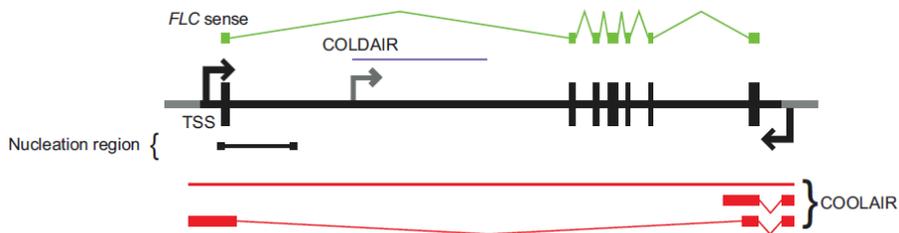


Figura 11. Rappresentazione schematica del gene *FLC* e dei suoi trascritti. Essi includono un trascritto senso (in verde), una serie di trascritti antisenso non-codificanti e alternativamente processati, la cui espressione è sovra-regolata in seguito all'esposizione a basse temperature (collettivamente, questi trascritti vengono denominati *COOLAIR* (in rosso); infine, un trascritto senso non-codificante, denominato *COLDAIR* (in viola).

In seguito alla produzione di *COOLAIR*, si assiste alla produzione di un trascritto senso non-codificante, denominato *COLDAIR* (*COLD ASSISTED INTRONIC NON-CODING RNA*) (Heo e Sung, 2011; Figura 11), che favorisce l'associazione delle proteine PHD (PLANT HOMODOMAIN) al core del complesso PRC2 già localizzato a livello del locus genico *FLC*. La formazione del complesso PHD-PRC2 determina l'accumulo del marchio istonico H3K27me3 a livello del primo introne di *FLC* (zona definita *NUCLEATION REGION*) con conseguente formazione di una cromatina meno accessibile alla RNA

Polimerasi II (Pol II) responsabile della formazione del trascritto codificante per *FLC*. Il risultato finale, quindi, è il silenziamento del gene (Song *et al.*, 2012).

Quando le rigide condizioni invernali terminano, si assiste ad un marcato rimodellamento del locus *FLC*, che rende il gene stabilmente silenziato per il resto del ciclo vitale della pianta (Angel *et al.*, 2011; De Lucia *et al.*, 2008; Finnegan e Dennis, 2007). Tale rimodellamento riguarda, in particolare, un ulteriore accumulo di H3K27me3 lungo tutta la regione genica di *FLC*, che, dopo la replicazione del DNA, è sgombra di tutti quei marchi istonici che non consentivano la deposizione di H3K27me3 sull'intera sequenza di *FLC* durante il periodo invernale (Song *et al.*, 2012).

Molti degli ecotipi di *Arabidopsis* che fioriscono indipendentemente dalla vernalizzazione possiedono una versione non funzionante del gene *FLC* oppure del gene *FRIGIDA* (*FRI*), regolatore positivo di *FLC*.

1.5. Il *pathway* del fotoperiodo: gli effetti della luce sulla transizione fiorale

Nel 1920, Garner e Allard osservarono che il periodo di esposizione di una pianta alla luce è un fattore fondamentale nel processo d'induzione alla fioritura. Tale osservazione portò alla definizione di fotoperiodo, definito come *ore relative di luce rispetto alle ore di buio*, e alla classificazione delle piante come *long days* (LD), *short days* (SD) o *day-neutral* (ND), in base alla loro necessità o meno di determinate ore di luce o di buio per fiorire.

La luce è uno dei fattori più importanti nel determinare il momento di fioritura di una pianta e, in particolare, la qualità della luce e il fotoperiodo. Il fotoperiodo, in particolare, subisce delle variazioni stagionali in base alle differenti latitudini. In quale modo le piante riescano a percepire tali variazioni ambientali e a rispondere in maniera adeguata è stato un mistero per molti decenni e ha cominciato ad essere compreso meglio grazie agli studi condotti su *Arabidopsis* e, in seguito, su riso (Izawa *et al.*, 2002).

In *Arabidopsis*, il gene responsabile di tale coordinazione è *CONSTANS* (*CO*), che attiva l'espressione del gene *FT*, che, migrando attraverso il sistema vascolare dalla foglia al meristema apicale (SAM), interagisce con un fattore di trascrizione di tipo b-ZIP, codificato dal gene *FD*, attivando l'espressione dei fattori trascrizionali *APETALA1* (*API*), *FRUITFUL* (*FUL*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (*SOC1*) (Abe *et al.*, 2005; Michaels *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005).

Collettivamente, tali fattori di trascrizione promuovono l'espressione dei geni a valle, noti come *geni dell'identità florale*, tra i quali *AGAMOUS* (*AG*), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) e *SEPELLATA 1-4* (*SEP*), responsabili del differenziamento del meristema florale (Abe *et al.*, 2005).

1.6. Segnali ormonali che regolano la fioritura

Gli ormoni vegetali, e in particolare l'acido giberellico (GA), giocano un ruolo fondamentale nella transizione florale nelle piante. GA svolge un ruolo di promotore florale in *Arabidopsis*, poiché è stato

osservato che mutazioni nella biosintesi di GA (*ga1*) o nella sua captazione (*gai*) falliscono o ritardano la fioritura in presenza di fotoperiodo breve (Wilson *et al.*, 1992). Inoltre, piante che sovra-esprimono *GA-20*, un gene che agisce a valle nel *pathway* di biosintesi dell'acido giberellico, mostrano una fioritura anticipata sia in condizioni di fotoperiodo corto che lungo (Huang *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 1999). Sulla base di tali osservazioni, si ipotizzò che il *pathway* GA è geneticamente distinto dal *pathway* del fotoperiodo e che agisce in un *pathway* a sé, rispetto ai *pathway* finora descritti, nel promuovere la transizione fiorale in *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 1999, Figura 4).

1.7. Le proteine MSI

Le proteine MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI; Ruggieri *et al.*, 1989) sono state inizialmente identificate in lievito e rappresentano una particolare classe di proteine contenenti domini ripetuti WD, identificate in tutti gli eucarioti studiati, ma assenti nei procarioti (Hennig *et al.*, 2005). Molte specie contengono geni MSI multipli, ma alcune specie, specialmente di insetti come *Drosophila*, possiedono una sola copia del gene *MSI* (Hennig *et al.*, 2005). Analisi filogenetiche suggeriscono un'origine monofiletica delle proteine MSI, con una diversificazione avvenuta indipendentemente molte volte (Hennig *et al.*, 2003).

1.7.1. Le proteine MSI di *Arabidopsis* e di mammifero

La proteina *FVE* di *Arabidopsis* mostra un'elevata omologia con le proteine di mammifero RETINOBLASTOMA ASSOCIATED PROTEIN 46 e 48 (RbAp46 e RbAp48) e con la proteina MSI di lievito (Qian e Lee, 1995; Ruggieri *et al.*, 1989).

Le proteine del tipo MSI di metazoi e di piante risultano essere proteine con WD-repeat, osservate per la prima volta nelle proteine G (GTP-binding proteins) eterotrimeriche (Fong *et al.*, 1986). Le proteine WD contengono sette domini WD40 ripetuti. Ognuna di queste sette ripetizioni forma una struttura a barilotto β , costituita ognuna da quattro foglietti β antiparalleli, organizzati a formare una struttura toroidale a forma conica, con un canale centrale (Wall *et al.*, 1995; Neer e Smith, 2000; Figura 12). Ognuna delle sette unità contiene un nucleo conservato costituito da 44-60 residui aminoacidici, che terminano con un residuo di triptofano (W) e aspartato (D). La particolarità di questa struttura consente alle proteine WD-repeat di interagire con diversi complessi proteici (Stirnemann *et al.*, 2010), tra i quali quelli coinvolti nel processamento dell'RNA, nella regolazione trascrizionale (Williams *et al.*, 1991; Hoey *et al.*, 1993), nella formazione del fuso mitotico (de Hostos *et al.*, 1991; Vaisman *et al.*, 1995), nella formazione delle vescicole di trasporto e nel traffico vescicolare (Pryer *et al.*, 1993) e nel controllo della divisione cellulare (Feldman *et al.*, 1997).

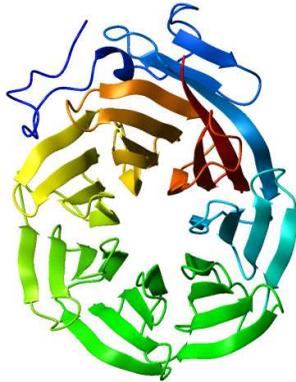


Figura 12 – Diagramma a nastro del dominio WD40 carbossi-terminale di Tup1 (un co-repressore trascrizionale in lievito) che assume una struttura a barilotto-beta costituita da sette foglietti beta antiparalleli. Il nastro è colorato con colori che vanno dal blu (estremità N-terminale) al rosso (estremità C-terminale).

Le proteine RbAp46 e RbAp48 furono originariamente identificate come soppressori tumorali associati al Retinoblastoma in uomo (Rb) (Loyola e Almouzni, 2004). Tuttavia, oltre a regolare Rb, le proteine del tipo MSI di metazoi, tra cui RbAp46 e RbAp48 e la proteina p55 di *Drosophila*, sono risultate essere componenti di varie tipologie di complessi che modificano e rimodellano la cromatina (Saganuma *et al.*, 2008). Specificamente, le proteine RbAp46 e RbAp48 di mammifero sono in grado di legare gli istoni mediante la formazione di dimeri istonici H3–H4 (Murzina *et al.*, 2008; Saganuma *et al.*, 2008) e costituiscono la subunità di numerosi complessi coinvolti nel rimodellamento e nell'assemblamento della cromatina (Loyola e Almouzni, 2004). RbAp46, in particolare, forma un complesso con l'istone acetiltransferasi HAT1 che acetila gli istoni H4, mentre

RbAp48 costituisce una subunità del complesso CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR-1 (CAF-1) coinvolto nella deposizione dei nucleosomi (Clapier e Cairns, 2009). Entrambe le proteine sono presenti, inoltre, in numerosi complessi contenenti HDAC, come il complesso Sin3 che deacetila il core istonico per reprimere la trascrizione genica (Clapier e Cairns, 2009).

Le proteine RbAp46/48 sono conservate dal punto di vista evolutivo negli animali e nelle piante (Clapier e Cairns, 2009).

In *Arabidopsis*, le proteine MSI possono essere suddivise in tre classi distinte dal punto di vista evolutivo: la prima classe costituita da MSI1, la seconda classe da MSI2 e MSI3 e, infine, la terza classe costituita da MSI4/FVE e MSI5. MSI1 è membro di numerosi complessi coinvolti nel rimodellamento e nell'assemblamento della cromatina durante la formazione dello sporofita, del gametofita e dello sviluppo del seme (Kaya *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2003; De Lucia *et al.*, 2008).

1.7.2. FVE e gli elementi trasponibili

In *Arabidopsis*, il ruolo di *FVE* non è limitato al solo *pathway* di fioritura (vedere capitolo 1.4.1, dove viene descritta la sua funzione in questo contesto). Essa, è coinvolta, inoltre, nel silenziamento dei TE e di sequenze ripetute, agendo come effettore del *pathway* RdDM (Bäurle e Dean, 2008; Gu *et al.*, 2011).

I TE furono scoperti in *Zea mays* da Barbara McClintock (1948), ma furono identificati in seguito in quasi tutti gli organismi analizzati, dagli archea ed eubatteri fino agli animali, piante, funghi e protisti

(Berg e Howe, 1989). I TE sono elementi dinamici, abbondanti e, soprattutto, giocano un ruolo fondamentale nell'evoluzione genica e genomica degli organismi. Una significativa percentuale del genoma degli eucarioti è costituito, infatti, da sequenze ripetute, tra le quali retroelementi (TE di classe I) e trasposoni a DNA (TE di classe II) (Bennetzen, 2005, Vicient, 2010). I trasposoni di classe I sono in grado di trasportare mediante un intermedio a RNA, mentre la maggior parte dei TE di classe II trasportano mediante un meccanismo definito "taglia e incolla". Esiste una terza classe di elementi trasportabili, che alcuni definiscono una sottoclasse dei retroelementi, gli elitroni, in grado di trasportare mediante un meccanismo definito a "rolling circle". La maggior parte dei trasposoni sono elementi non-autonomi, ovvero necessitano di funzioni svolte da altri elementi della stessa famiglia per trasportare.

Nelle piante, i TE più diffusi sono i retrotrasposoni LTR (*long terminal repeat*), che costituiscono, ad esempio, più dell'80% del genoma nucleare delle angiosperme (Bennetzen, 2005). Anche gli elementi SINE e LINE, anch'essi di classe I, sono diffusi nel genoma delle piante, ma sono molto meno abbondanti degli LTR (Bennetzen, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato che i retroelementi, e in particolare gli LTR, hanno svolto e continuano a svolgere un importante ruolo nella struttura, funzione ed evoluzione del genoma di piante superiori (Baucom *et al.*, 2009). Dall'altro lato, tuttavia, i trasposoni possono essere pericolosi. La loro attivazione è in grado di causare un impressionante grado di mutazioni. Non sorprende, pertanto, l'esistenza di numerosi meccanismi epigenetici che si sono

evoluti per riconoscere e silenziare questi elementi, formando una sorta di “sistema immunitario cellulare”, la cui funzione non è solo quella di inattivare i trasposoni, ma anche di ricordare e trasmettere tale “memoria” alle generazioni successive (Slotkin e Martienssen, 2007; Goodrich e Tweedie, 2002). Tale sistema di sopravvivenza riconosce molecole di RNA aberrante, prodotte dai trasposoni o dai virus, ma non dai geni dell’ospite. Le molecole di RNA vengono convertite in RNA a doppio filamento (dsRNA) e subito processate in molecole di 21-26 nucleotidi dall’endonucleasi DICER. Un filamento delle molecole di short interfering RNA (siRNA) viene caricato sul complesso RISC, che include un membro della famiglia AGO. Tale complesso guida la molecola di siRNA verso il trascritto target, che viene, quindi, degradato dallo stesso RISC. Tale meccanismo viene definito silenziamento post-trascrizionale (PTGS). Nelle piante, oltre alla degradazione dell’RNA aberrante, è presente un meccanismo di silenziamento trascrizionale (TGS), guidato dal *pathway* RdDM, che causa il rimodellamento della cromatina e la metilazione del DNA a livello dei trasposoni (Zaratiegui *et al.*, 2007; Slotkin e Martienssen, 2007; Matzke e Birchler, 2005). Il silenziamento trascrizionale determinato dal *pathway* RdDM prevede il contributo finale del complesso effettore che contiene FVE. In questo complesso sono presenti, oltre a FVE, vari componenti, tra cui, HDAC, istone demetilasi e istone metiltransferasi. Il risultato dell’azione di questo complesso è la creazione di modifiche istoniche correlate a una cromatina trascrizionalmente inattiva, come l’eliminazione dei residui acetilati, di H3K4me2 e H3K4me3 e il deposito del marchio

eterocromatinico H3K9me2. Quest'ultimo, in particolare, risulta associato alla metilazione del DNA. Infatti, esiste una correlazione positiva tra H3K9me2 e la metilazione delle citosine, soprattutto nei contesti CHG e CHH e entrambi i processi sembrano rinforzarsi vicendevolmente (Bologna e Voinnet, 2014).

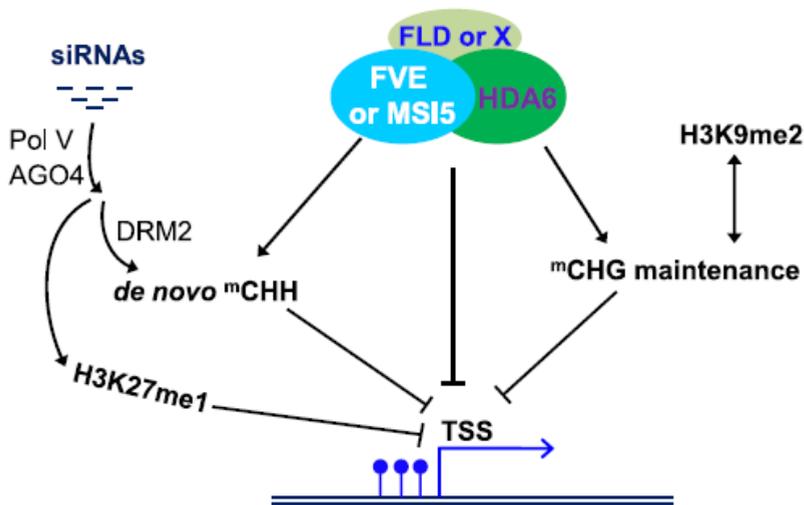


Figura 13. Silenziamento cromatinico di TE e sequenze ripetute mediato dal *pathway* RdDM. Il complesso contenente FVE-MSI5 guida, da un lato, la deacetilazione degli istoni e, molto probabilmente, la demetilazione di H3K4, reprimendo direttamente la trascrizione del *locus* in esame. Dall'altro lato, insieme ai marchi istonici H3K9me2 e H3K27me1, stabilisce uno *status* cromatino sfavorevole alla trascrizione del trasposone, il quale viene rifornito dalla successiva metilazione delle citosine. I lecca-lecca blu indicano citosine metilate e "X" indica un putativo omologo di FLD (tratto da Gu *et al.*, 2011).

1.7.3. I geni *nfc101* e *nfc102* di mais

Nel 2001, in mais, fu caratterizzato un cDNA codificante una proteina contenente domini WD, a cui fu dato il nome di RbAp1 (RETINOBLASTOMA-ASSOCIATED PROTEIN1), poiché essa mostrava caratteristiche strutturali e funzionali simili ai membri della famiglia proteica MSI/RbAp e, in particolare, alle proteine di mammifero RbAp (Rossi *et al.*, 2001). Analogamente a queste ultime, ZmRbAp1 lega gli istoni H4 acetilati e, in misura minore, gli istoni H3 (Rossi *et al.*, 2001).

Analisi del profilo di espressione di ZmRbAp1 hanno suggerito un suo coinvolgimento nelle fasi precoci di formazione dell'endosperma. Un profilo di espressione simile era già stato osservato in passato per la proteina Y1 di *S. latifolia* (Delichere *et al.*, 1999), membro di una vasta famiglia di proteine contenenti domini WD, che mostrano il 75% di identità aminoacidica con ZmRbAp1 (Rossi *et al.*, 2001).

È stato osservato che la proteina ZmRbAp1, grazie alla sua struttura a barilotto β , sembra funzionare come una sorta di piattaforma all'interno del complesso Rpd3/RBR1 (RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN), coinvolto nella regolazione della transizione G1/S del ciclo cellulare. All'interno di questo complesso, RbAp recluterebbe e stabilizzerebbe i diversi componenti e, in particolare, favorirebbe l'interazione tra Rpd3 e RBR1 (Rossi *et al.*, 2003; Figura 14). Grazie alla sua capacità di legare gli istoni, ZmRbAp1 potrebbe giocare, inoltre, un ruolo fondamentale nel reclutamento di tale complesso a livello della cromatina dove, dirigendo modificazioni

istoniche, partecipa alla repressione dell'espressione di numerosi geni target (Rossi *et al.*, 2003; Varotto *et al.*, 2003).

In mais, in seguito, furono identificati altri quattro geni appartenenti alla famiglia MSI/RbAp, denominati *NFC* dalla Plant ChromatinDB USA Initiative (<http://www.chromdb.org>), poiché essi mostrano omologia con un componente del complesso NURF (NUCLOSOME REMODELLING FACTOR), un complesso multiproteico che regola la trascrizione genica catalizzando lo slittamento dei nucleosomi (Kwon e Wagner, 2007).

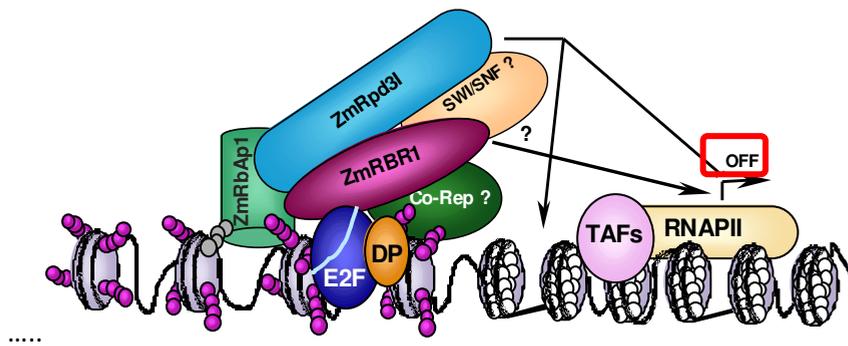


Figura 14 – Rappresentazione schematica del complesso RbAp1-Rpd3-RBR1, in grado di legare gli istoni e coinvolto nella transizione G1/S del ciclo cellulare (tratto da Rossi *et al.*, 2003).

La struttura della cromatina e la dimensione dei fattori rappresentati in questa immagine hanno il solo scopo rappresentativo.

Sulla base dell'omologia di sequenza con i geni *MSI* di *Arabidopsis*, i geni *NFC* di mais sono stati suddivisi in due gruppi distinti (<http://www.chromdb.org>; Figura 15). Il primo gruppo contiene i geni *NFC103*, *NFC104* e *NFC108*, putativi ortologi dei tre geni di

Arabidopsis omologhi a *MSI1*, coinvolti nella regolazione epigenetica di numerosi processi dello sviluppo riproduttivo (Hennig *et al.*, 2005; Jullien *et al.*, 2008).

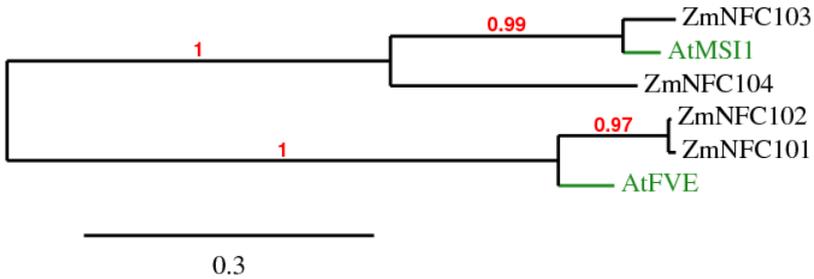


Figura 15 – Rappresentazione schematica della distanza evolutiva tra i geni *NFC* di mais (indicati in nero) e i geni *MSI1* e *FVE* di *Arabidopsis* (indicati in verde) (tratto da Rossi *et al.*, 2003).

Il secondo gruppo è costituito dai geni *NFC101* E *NFC102* (originariamente chiamato *ZmRbAp1*), strettamente correlati al gene *FVE/MSI4* di *Arabidopsis*, componente del *pathway* autonomo di fioritura (Ausìn *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004) e coinvolto nella regolazione della stabilità dell'epigenoma (Baürle e Dean, 2008; Figura 15).

1.8. La regolazione della fioritura nelle principali piante di interesse agronomico

Gli studi effettuati sulla pianta modello *Arabidopsis* hanno consentito di comprendere la maggior parte dei meccanismi che regolano la fioritura nelle piante. Studi recenti hanno dimostrato che molti

meccanismi che regolano la fioritura nei cereali sono conservati rispetto ad *Arabidopsis*; tuttavia, molte piante hanno sviluppato meccanismi specifici sia di regolazione della fioritura sia di adattamento all'ambiente circostante (Colasanti e Coneva, 2009).

La caratteristica che accumuna tutte le piante è che la transizione fiorale ha luogo nel SAM, che deve essere in grado di percepire i segnali che lo inducono a produrre l'infiorescenza e i meristemi fiorali. Sebbene nelle piante il SAM costituisca il bersaglio di questi segnali, nella maggior parte dei casi questi segnali si originano nei tessuti vegetativi, solitamente nelle foglie. Questi segnali, siano essi ambientali o endogeni (Figura 16), inducono la produzione di una proteina mobile, denominata florigeno, in grado di migrare dalle foglie al SAM. Se si considerano i meccanismi molecolari che portano dalla percezione del segnale, che induce la fioritura, alla conversione del SAM da meristema vegetativo a meristema fiorale, essi sono altamente conservati in tutte le angiosperme. La conservazione di tali meccanismi è dovuta fondamentalmente al fatto che la percezione del segnale, lo sviluppo del meristema fiorale e poi del fiore costituiscono funzioni ancestrali condivise da tutte le piante a fiore. Al contrario, il meccanismo tramite il quale i segnali ambientali o endogeni vengono convertiti in segnali molecolari in grado di scatenare una risposta nella pianta costituisce, invece, un aspetto che può essere specifico per ciascuna specie. Poiché la transizione fiorale è strettamente determinata dalle condizioni ambientali nelle quali una pianta si sviluppa, essa ha sfruttato tutti i processi a sua disposizione e ne ha inventati di nuovi al fine di ottimizzare la transizione fiorale. Questo

fatto non deve stupire se si considera che piante come il mais hanno una sola possibilità di fiorire e di produrre semi nella loro vita.

Rispetto al meccanismo di fioritura in *Arabidopsis*, le altre piante condividono, pertanto, meccanismi ancestrali, ma hanno anche evoluto delle particolarità che rendono il loro meccanismo di fioritura unico (Colasanti e Coneva, 2009).

In molte piante di interesse agronomico, sono stati ad oggi identificati numerosi geni omologhi ai geni coinvolti nei diversi *pathway* di fioritura in *Arabidopsis* (Yano *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2003; Hayama *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2003; Faure *et al.*, 2007; Danilevskaya *et al.*, 2008). Nel mais, ad esempio, sono presenti almeno 15 geni che codificano per proteine leganti una fosfatidil-etanolamina (PEBP) e che presentano omologia con il gene *FT* di *Arabidopsis*. Tali geni furono denominati *ZCN* (*Zea mays CENTRORADIALIS*), in seguito alla clonazione del primo gene PEBP in *Antirrhinum* (Bradley *et al.*, 1996). Il gene *ZCN8*, in particolare, codifica per una proteina presentante le tipiche caratteristiche del florigeno (Lazakis *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011). Come atteso, infatti, la riduzione dell'espressione di *ZCN8* correla con un ritardo di fioritura accompagnato ad un aumento del numero di foglie emesse durante la fase vegetativa (Danilevskaya *et al.*, 2011).

Il mais possiede, tuttavia, un gene, denominato *Indeterminate1* (*Id1*), che svolge una funzione chiave nella transizione fiorale e che è assente nella pianta modello *Arabidopsis*, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di regolazione genica tipico, probabilmente, dei soli cereali (Colasanti e Coneva, 2009; Colasanti *et al.*, 1998; Kozaki *et*

al., 2004). *Id1* codifica per un fattore trascrizionale espresso nelle foglie. L'ipotesi più accreditata suggerisce che esso regoli sia la produzione che la trasmissione del florigeno.

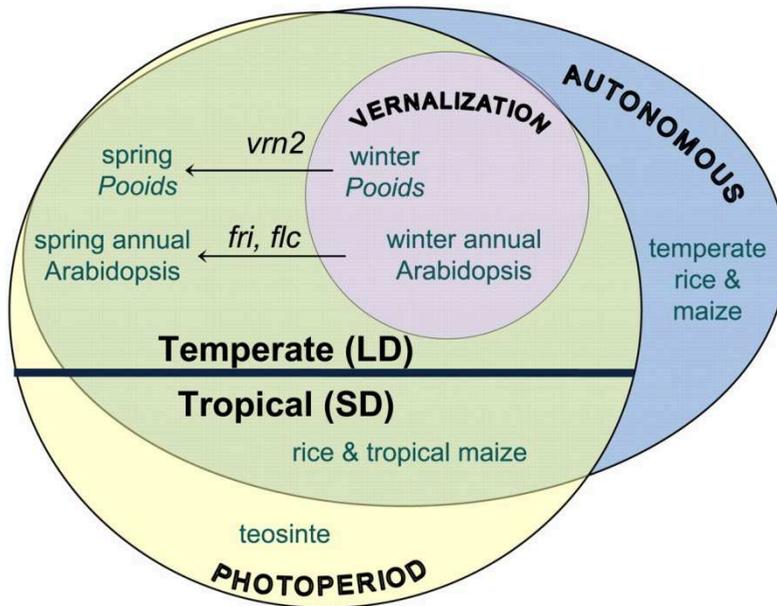


Figura 16 – Rappresentazione schematica dei meccanismi che inducono la fioritura nelle principali piante di interesse agronomico e in *Arabidopsis* (tratto da Colasanti e Coneva, 2009).

1.9. La regolazione della fioritura in mais

1.9.1. L'importanza del cereale *Zea mays*

Il mais (*Zea mays* ssp. *mays*) è attualmente la terza più importante risorsa alimentare mondiale e il cereale con la più elevata produttività per ettaro di terreno coltivato (Hubert *et al.*, 2010).

Si stima che entro il 2050, la domanda mondiale di mais incrementerà di oltre l'80% (Hubert *et al.*, 2010).

La produzione su larga scala di ibridi di mais è stata resa possibile grazie alla separazione fisica tra il fiore femminile e il fiore maschile che caratterizza questo cereale, la quale consente un'impollinazione controllata (Strable e Scanlon, 2009) con un conseguente notevole aumento della produttività rispetto al mais puro (Lee e Tollenaar, 2007).

Tra i cereali, che includono altre specie modello come riso (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), grano (*Triticum ssp.*) e orzo (*Hordeum vulgare*), il mais è uno dei sistemi modello più studiati per quanto riguarda la biologia vegetale, l'evoluzione del genoma, la fisiologia dello sviluppo, l'epigenetica, la resistenza ai pesticidi, l'eterosi e la genomica comparativa (Strable e Scanlon, 2009).

Sebbene siano disponibili centinaia di linee pure, le più utilizzate dal punto di vista scientifico sono B73, Mo17 e W22 (Strable e Scanlon, 2009).

1.9.2. Le origini tropicali del mais: cenni storici

Le prime notizie sul mais e la sua coltivazione provengono dal diario di bordo del primo viaggio di Cristoforo Colombo nelle Americhe, il cui originale è andato disperso, ma il cui contenuto è pervenuto sino a noi nelle versioni di Bartolomé de Las Casas e di Fernando Colombo.

La prima esplorazione delle Antille (isole Bahamas e Cuba) avvenuta tra il 12 ottobre 1492 e il 16 gennaio 1493, coincideva con il periodo vegetativo della coltura di mais, che era iniziata a settembre e sarebbe

terminata con la maturazione di marzo-aprile. Qui Colombo osservò il mais in piena vegetazione, nel periodo di comparsa dell'inflorescenza maschile e nella sua inesperienza lo paragonò al *panizio* (sorgo o panico), comune all'epoca nella regione lombarda italiana e caratterizzato da una pannocchia terminale bisessuata e semifera. Il cereale americano, pur avendo un'inflorescenza terminale (maschile e non semifera) presentava invece i semi riuniti su spighe laterali, avvolte da guaine protettive ed evidenti solo a maturità.

Piccoli campioni di mais giunsero in Spagna e in Portogallo sin dal primo rientro di Colombo dal Nuovo Mondo nel 1493 e furono inviati prontamente alla Sede Pontificia in Roma e, da lì, ai Principi italiani progressisti.

La coltivazione del nuovo cereale si affermò tuttavia lentamente. La coltivazione in Spagna, Francia e Italia di mais provenienti dalle Antille, zona tropicale caratterizzata da fotoperiodo corto e regime termico costantemente caldo, trovò grande difficoltà nelle latitudini più elevate, caratterizzate da basse temperature, che impedivano la coltivazione nella stagione invernale a fotoperiodo corto e cortissimo e da fotoperiodo lungo nella stagione estiva.

Le difficoltà biologiche di adattamento dei mais tropicali insulari alle condizioni climatiche dei paesi europei spiegano il lungo periodo che intercorse tra la prima comparsa in Europa e l'affermazione del nuovo cereale nell'agricoltura europea: è evidente che la coltivazione del mais nel Vecchio Mondo coincise con la nuova disponibilità di varietà precoci provenienti da zone costiere o elevate, ma temperate della terra ferma, resa possibile dagli insediamenti spagnoli nella Nuova

Spagna (Messico – Guatemala, 1519-23), nella Nuova Castilla (Perù e Cile, 1525-30) e nella Nuova Granada (Venezuela e Colombia, 1539-50).

Il ruolo del nostro paese nella diffusione del mais in Europa fu di grande rilievo. In estesa coltivazione nei territori della Repubblica di Venezia e nella Campania, il mais raggiunse rapidamente l'Ungheria, attraverso la Carinzia. I portoghesi portarono il mais dal Brasile, in Africa e in Asia, raggiungendo la Costa d'Oro, la Guinea e il Congo nel 1560, la Cina nel 1565 e il Giappone nel 1573. Nello stesso periodo (1530-80), i viaggi di esplorazione francesi e inglesi nel Nordamerica favorirono l'introduzione nelle regioni europee atlantiche dei mais precocissimi originari delle coste nordatlantiche e canadesi.

La valorizzazione della nuova coltura nelle agricolture iberica, italiana e balcanica incontrò una fase di rapido sviluppo nei secoli XVII e XVIII, periodo nel quale le ricorrenti carestie, causate da eventi climatici e da frequente e prolungata conflittualità, trovarono una soluzione nella nuova disponibilità di granaglie offerta dalla coltivazione estiva del mais.

1.9.3. Il progenitore del mais: implicazioni nella regolazione della fioritura

La specie *Zea mays*, da 500 anni nota in Italia come *Formentone*, *Granoturco* o *Meliga*, comprende numerose forme coltivate (cultivar o agro-ecotipi), risultato di un lungo e diversificato processo evolutivo che, negli ultimi 7000-10000 anni, è stato condizionato ed orientato

dall'uomo in funzione degli specifici ambienti e delle diverse esigenze e culture alimentari.

L'identità del progenitore selvatico del mais rimase sconosciuta per molti decenni.

A differenza, infatti, di altri cereali, come il grano (*Triticum* ssp.) e il riso (*Oryza sativa*), la cui morfologia è rimasta praticamente invariata rispetto ai rispettivi progenitori, non si conosce una pianta selvatica dall'aspetto simile a quello della pianta di mais (Doebley, 2009).

Un'interessante e minuziosa analisi dei passi evolutivi che hanno contribuito all'addomesticamento e alla differenziazione morfostrutturale del mais è stata sintetizzata principalmente da Galinat (1988), da Iltis (2000) e da Doebley (2004), i quali concordano nell'indicare una divergenza evolutiva recente del cultigeno mais da uno o più *taxa* di teosinte, riprendendo e confermando l'ipotesi sostenuta anni prima da Beadle (Doebley, 2009).

Confermati in seguito anche da analisi molecolari, i loro studi indicano il *taxon parviglumis* (*Zea mays* ssp *parviglumis*) come il più prossimo parente del moderno mais e, molto probabilmente, il progenitore diretto.

Nonostante mais e teosinte divergano morfologicamente nell'architettura della pianta e della spiga (Figura 17), essi sono citologicamente simili e interfertili (Doebley, 2006).

La figura 17 mostra le sostanziali differenze architettoniche tra le piante di mais moderno e di teosinte e tra i loro rispettivi semi-frutti.

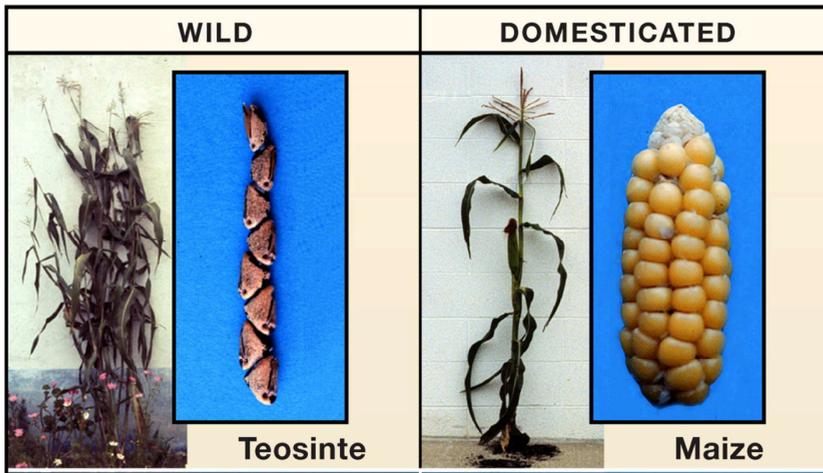


Figura 17 - Differenze morfologiche tra le piante di teosinte e di mais moderno e tra i loro rispettivi semi-frutti (tratto da Doebley *et al.*, 2006).

La pressione selettiva sui tratti che controllano principalmente la ramificazione della pianta e l'infiorescenza femminile (spiga) hanno determinato profondi cambiamenti nell'architettura della pianta di mais moderno e nella sua capacità produttiva rispetto al suo progenitore. A differenza del teosinte, che presenta ramificazioni multiple, la pianta di mais moderno concentra tutte le risorse fotosintetiche in un unico stelo, secondo un fenomeno noto come *dominanza apicale*, carattere comune a molte *cultivar*. Tale fenomeno sembra essere controllato principalmente dal gene *teosinte branched1* (*Tb1*), codificante un fattore di trascrizione che controlla la formazione dei meristemi ascellari nella pianta di mais (Doebley *et al.*, 1997).

Oltre a cambiamenti strutturali nella morfologia della pianta che hanno determinato un notevole aumento della produttività, un'altra caratteristica, sebbene meno ovvia, del mais moderno rispetto al suo progenitore, è la sua notevole espansione geografica (Kuleshov, 1933). Il mais cresciuto a latitudini elevate non può utilizzare il solo fotoperiodo, caratterizzato da giorni che si accorciano troppo rapidamente, come unico fattore che determina la transizione fiorale. Nei climi temperati, il fotoperiodo che consente uno sviluppo fiorale ottimale è di scarsa durata e ciò non consentirebbe alla pianta di terminare il suo sviluppo riproduttivo prima dell'avvento dell'inverno. Pertanto, sebbene una certa dipendenza dal fotoperiodo esista tra le diverse linee pure di mais (Russell e Stuber, 1983), il mais temperato si è adattato a crescere ad elevate latitudini utilizzando principalmente altri fattori per indurre la transizione fiorale, come l'età della pianta e il suo status fisiologico. Di conseguenza, l'induzione fiorale nel mais temperato è quasi esclusivamente dipendente dal *pathway* autonomo di fioritura (Doebley *et al.*, 2006).

1.9.4. Segnali endogeni come indicatori dell'età della pianta

Il meristema apicale del mais temperato B73 produce circa 16-18 foglie prima che l'infiorescenza maschile, il pennacchio, sia visibile (Figura 18). La produzione di foglie termina, infatti, quando la pianta riceve i segnali necessari (siano essi ambientali o endogeni) che la inducono ad attuare la transizione fiorale.

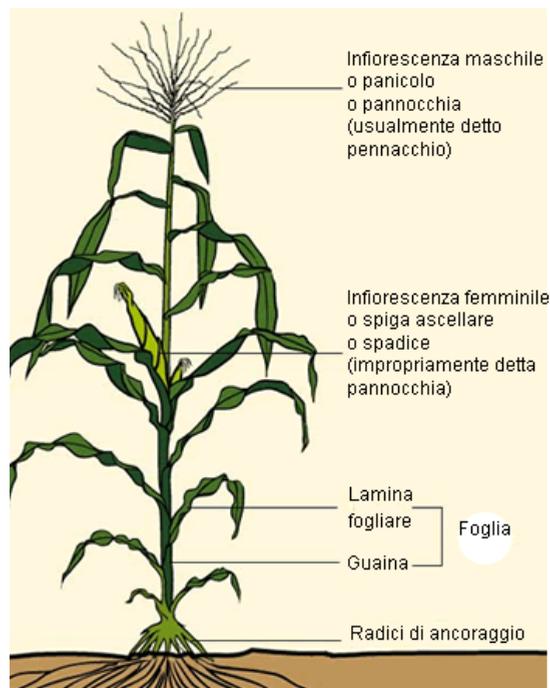


Figura 18 – Morfologia della pianta di mais (tratto da <http://www.my-personaltrainer.it/alimentazione/mais.html>).

Il numero di foglie emesse durante la fase vegetativa dipende dal “background” genetico della pianta, ma generalmente varia tra le 16 e le 22 (Russell e Stuber, 1983). Nel mais temperato B73, la transizione fiorale comincia approssimativamente quando la pianta ha prodotto sette foglie, o cinque nodi circa, stadio definito V7 (Meng *et al.*, 2011). Similarmente alla B73, la transizione fiorale nella maggior parte delle linee temperate di mais avviene ad uno stadio di sviluppo preciso, in corrispondenza del quale il meristemo vegetativo comincia a trasformarsi in meristemo riproduttivo, dando origine all’infiorescenza maschile detta pennacchio (Galinat e Naylor, 1951).

L'infiorescenza femminile, la spiga, si origina invece da meristemi ascellari localizzati diversi nodi sotto l'apice (McSteen *et al.*, 2000) (Figura 18).

Esperimenti condotti con colture di germogli apicali di mais, privati del meristema apicale (SAM) dopo aver originato un numero preciso di primordi fogliari, hanno permesso di fare osservazioni interessanti riguardo la fioritura. È stato osservato, ad esempio, che il meristema è in grado di originare il pennacchio solo dopo aver nuovamente emesso un determinato numero di foglie (Irish e Nelson, 1991). Tale osservazione suggerisce che il meristema è in grado di “gestire” le informazioni riguardanti il numero di foglie prodotte, prevenendo la fioritura in una pianta non ancora completamente sviluppata.

Osservazioni condotte sul tabacco, pianta anch'essa temperata (ND), indicano l'esistenza di un meccanismo simile a quello appena descritto in mais (Doebley *et al.*, 2006).

1.10. Geni di mais in grado di influenzare la transizione florale

Sebbene in mais siano stati identificati numerosi QTLs (*quantitative trait loci*) associati alla fioritura (Chardon *et al.*, 2004; Buckler *et al.*, 2009), l'identità dei geni derivanti da tali *loci* è per lo più tuttora sconosciuta. In mais, infatti, sono disponibili pochi mutanti nella transizione florale. L'unico QTL finora identificato che causa rilevanti effetti sulla fioritura in mais è *VEGETATIVE TO GENERATIVE TRANSITION1* (*Vgt1*) (Phillips *et al.*, 1992; Vlăduțu *et al.*, 1999; Salvi *et al.*, 2002), localizzato sul cromosoma 8 e confinato in una regione

intergenica coinvolta nella regolazione dell'espressione del gene *ZmRap2.7* (un gene omologo a *APETALA2* di *Arabidopsis*). *Vgt1* è correlato alla variazione di sequenze non codificanti e alla loro metilazione, suggerendo che la variazione della fioritura controllata da *Vgt1* avvenga mediante un meccanismo epigenetico, quale la modificazione della cromatina che regola il legame di fattori di trascrizione, enhancer e silencer, che giocano un ruolo fondamentale nella regolazione in cis del gene *ZmRap2.7* (Salvi *et al.*, 2007).

La perdita funzionale del gene *DLF1* (*DELAYED FLOWERING1*) causa nelle piante di mais un marcato ritardo di fioritura. Il gene *DLF1* codifica per un fattore di trascrizione di tipo b-zip, omologo alla proteina FD di *Arabidopsis*. Saggi dei due ibridi hanno dimostrato che *DLF1* interagisce fisicamente con *ZCN8* nel SAM e se over-espressi, essi sono in grado di promuovere la transizione fiorale sia in mais che in *Arabidopsis* (Danilevskaya *et al.*, 2008a; Lazakis *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011).

Mutazioni nel gene *ZFL2* (*ZEA FLORICAULA/LEAFY2*), un ortologo del gene omeotico *LEAFY* di *Arabidopsis*, che regola lo sviluppo dell'infiorescenza, sono in grado di influenzare fortemente la transizione fiorale in mais (Chardon *et al.*, 2004; Bomblies e Doebley, 2006).

Di seguito vengono descritti in dettaglio alcuni geni di mais che regolano la fioritura, che sono tra i meglio caratterizzati e che sono stati studiati nel corso del presente lavoro.

1.10.1. I geni *ZMM4* e *ZMM15*

Il target meglio caratterizzato della proteina FVE di *Arabidopsis* è il repressore della fioritura *FLC* (He, 2009). Sebbene il mais possieda numerosi geni MADS-box, alcuni dei quali coinvolti nel *pathway* di fioritura, per nessuno di essi è stata finora comprovata un'omologia funzionale a *FLC* (Colasanti e Coneva, 2009).

Nel 2008, il gruppo di Olga Danilevskaya (2008b) identificò due geni paraloghi di tipo MADS-box, *ZMM4* (*ZEA MAYS MADS-box 4*) e *ZMM15*. Essi formano coppie geniche duplicate *ZMM4-ZMM24* e *ZMM15-ZMM31*, sinteniche al locus *vrn1* (*vernalization1*) di frumento, coinvolto nella transizione fiorale nelle varietà invernali di frumento in seguito all'esposizione a basse temperature (Danyluk *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2003). *ZMM4* e *ZMM15* appartengono alla famiglia genica *FRUITFUL*, coinvolta nella regolazione della fioritura nei cereali temperati, mentre *ZMM24* e *ZMM31* sono filogeneticamente correlati alla famiglia genica *SEPELLATA*, una classe di geni coinvolti nell'identità degli organi fiorali richiesta per lo sviluppo del fiore (Pelaz *et al.*, 2000; Malcomber e Kellogg, 2005; Malcomber *et al.*, 2006). Tutti e quattro questi geni sono espressi in mais in maniera coordinata durante lo sviluppo dell'infiorescenza dopo che è avvenuta la transizione fiorale. La loro espressione è invece ritardata sia nei mutanti *dlf1* che *idl1*. Nel 2010 fu messa a disposizione una lista di 25 geni di mais di tipo MADS-box codificanti per proteine coinvolte nel *pathway* di fioritura, denominate FLCP (FLOWERING CONTROL-

ASSOCIATED PROTEINS) (Plant Chromatin initiative, <http://www.chromdb.org/>; update of March, 2010).

1.10.2. Il gene *DLF1*

Il gene *DLF1* fu clonato nel 2006 dal gruppo di Michael Muszynski (Muszynski *et al.*, 2006). Esso codifica per un fattore trascrizionale di tipo bZIP (basic Leu zipper) omologo alla proteina FD di *Arabidopsis*. Entrambe sono espresse, infatti, nel meristema apicale prima, durante e in seguito alla transizione fiorale (Wigge *et al.*, 2005).

I mutanti *dlf1* mostrano un ritardo di fioritura meno marcato rispetto ai mutanti *indeterminate1*, descritti di seguito. Tuttavia, essi, prima di attuare la transizione fiorale, producono 5-9 foglie in più rispetto alla pianta selvatica, fiorendo 1-2 settimane più tardi (Muszynski *et al.*, 2006). Oltre a un ritardo di fioritura, i mutanti *dlf1* sono caratterizzati da un alterato sviluppo dell'infiorescenza femminile, producendo più spighe rispetto alla pianta selvatica (Muszynski *et al.*, 2006).

L'espressione spazio-temporale di *DLF1* è simile a quella di *FD* di *Arabidopsis*. In *Arabidopsis*, inoltre, la proteina FD interagisce a livello del SAM con il florigeno FT, per promuovere la trascrizione dei geni *API*, *FUL*, and *CAL*, responsabili della conversione del meristema vegetativo in meristema riproduttivo (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Analogamente, è stato dimostrato che *DLF1* interagisce con *ZCN8* di mais per attivare i geni che promuovono la transizione fiorale (Muszynski *et al.*, 2006).

1.10.3. Il gene *Id1*

Le mutazioni nel gene *Id1* (*Indeterminate1*) causano gli effetti più severi che si conoscano a livello di ritardo di fioritura nel mais. Analogamente ai mutanti di fioritura di altre specie, i mutanti *id1* di mais sono incapaci di attuare una normale transizione fiorale rimanendo in uno stato vegetativo perenne (Galinat e Naylor, 1951).

Tuttavia, a differenza dei mutanti caratterizzati in *Arabidopsis* e in pisello, i mutanti *id1*, dopo aver emesso 27 foglie o più, producono delle infiorescenze aberranti dalle caratteristiche vegetative (Colasanti *et al.*, 1998; Kozaki *et al.*, 2004; Colasanti e Muszynski, 2008). Il pennacchio di questi mutanti è detto a “palla di spighette” (Figura 19b) e da ognuna di queste spighette può originarsi un’intera piantina (Colasanti *et al.*, 1998). I meristemi ascellari, inoltre, non sono in grado di originare infiorescenze femminili, ma formano una sorta di ramificazioni secondarie della pianta (Figura 19a). Il fenotipo di questi mutanti non solo dimostra il coinvolgimento di *Id1* nella transizione fiorale, ma anche nel mantenimento di uno stato riproduttivo competente (Coneva *et al.*, 2007).

Id1 codifica per un putativo fattore di trascrizione di tipo zinc-finger che si localizza a livello nucleare (Colasanti *et al.*, 1998).

In vitro, *Id1* è in grado di legare un motivo di DNA consenso di 11 bp (Kozaki *et al.*, 2004; Wong e Colasanti, 2007), suggerendo un suo possibile ruolo nella regolazione dell’espressione di altri geni (Kozaki *et al.*, 2004).

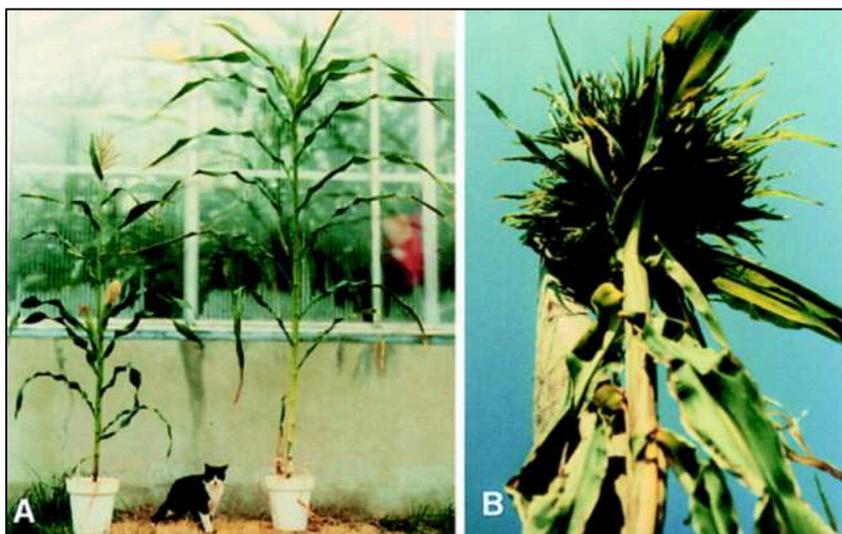


Figura 19 – (A) Confronto tra la pianta normale e il mutante *id1/id1*. Le piante sono state cresciute nelle stesse condizioni. La pianta selvatica (a sinistra) ha 13 foglie, un pennacchio normalmente sviluppato e due spighe. Il mutante *id1/id1* (a destra) ha 20 foglie e non mostra nessun segnale di fioritura. (B) Tipico “pennacchio” del mutante *id1/id1* detto “a palla di spighe”, visibile normalmente dopo 32 foglie (tratto da Colasanti *et al.*, 1998).

La proteina Id1 è espressa esclusivamente nella foglia immatura (Figura 20), ovvero nella foglia non ancora fotosinteticamente attiva, fin dai primi stadi dello sviluppo della pianta, raggiungendo l’apice di espressione in corrispondenza della transizione fiorale (stadio V7 in B73). È interessante notare che la proteina Id1 non è espressa né nelle foglie mature né nel meristemo apicale, dove ha luogo la transizione fiorale (Colasanti *et al.*, 1998). Id1, inoltre, non è in grado di migrare attraverso i tessuti, ma rimane localizzata a livello dei nuclei tissutali nei quali è stata prodotta (Wong e Colasanti, 2007). Tali osservazioni hanno fatto da subito supporre che Id1 sia coinvolta direttamente o

indirettamente nella regolazione di un putativo florigeno di mais, che dalle foglie mature, trasmette al meristema apicale il segnale che induce la transizione fiorale (Colasanti *et al.*, 1998), in seguito identificato in ZCN8.

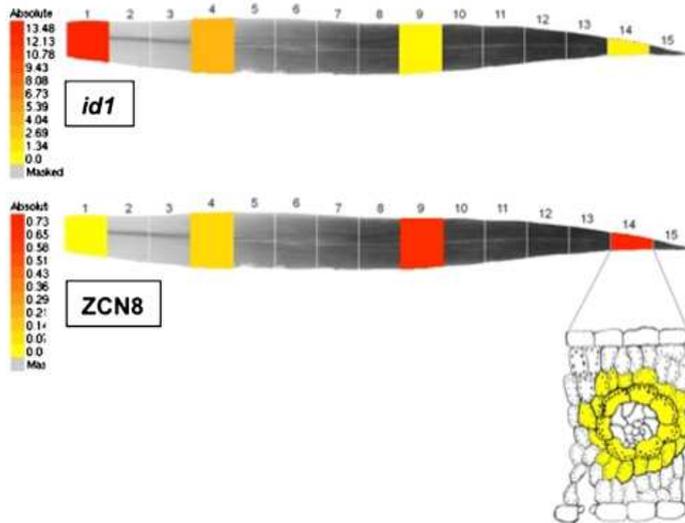


Figura 20 – I livelli assoluti di espressione di *Id1* e di *ZCN8* nella terza foglia di mais B73 (rilevati mediante pittogramma elettronico a fluorescenza - eFP browser image from BAR, Botanical Array Resource, Università di Toronto) mostrano che le zone di espressione delle due proteine non si sovrappongono.

L'immagine sottostante, rappresentante una sezione ingrandita della foglia, indica che il trascritto di *ZCN8* non è rilevabile nella guaina fogliare e nelle cellule del mesofillo (tratto da Lazakis *et al.*, 2008).

Id1 è il membro fondatore di una vasta famiglia di proteine presente in tutte le piante superiori, caratterizzata dal dominio IDD (INDETERMINATE DOMAIN), che si estende da un segnale di localizzazione nucleare (NLS) fino all'estremità amino-terminale della

proteina Id, comprendendo quattro motivi zinc-finger (ZF1 – ZF4) di tipo Cys2His2. Gli zinc-finger di tipo Cys2His2 sono, negli eucarioti, tra i fattori di trascrizione meglio caratterizzati e sono principalmente coinvolti nei processi di sviluppo (Bieker, 2001; Klug e Schwabe, 1995).

Nel genoma di mais sono presenti 20 membri della famiglia IDD (*ZmIDD*), 15 nel genoma di riso (*OsIDD*) e 16 nel genoma di *Arabidopsis* (*AtIDD*) (Colasanti *et al.*, 2006). Analogamente a quanto osservato in mais, gli omologhi di *Id1* presenti in altre specie, come sorgo (*SbID*) e riso (*OsID1*), mostrano un elevato accumulo nelle foglie immature. In particolare, *OsID1*, anche chiamato *RID1* o *Ehd2* (*HEARLY HEADING DATE2*), mostra non solo omologia di sequenza, ma anche omologia funzionale a ID1 di mais e sembra essere richiesto per l'induzione della fioritura indipendentemente dal fotoperiodo (Matsubara *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

I mutanti di riso con una ridotta espressione di *Id1* mostrano, infatti, un ritardo di fioritura anche in presenza di un fotoperiodo induttivo a giorni corti. I mutanti *knock-out* mostrano addirittura incapacità completa di attivare la transizione fiorale (Wu *et al.*, 2008).

Sebbene ad oggi non sia stato identificato un ortologo di *Id1* in *Arabididopsis*, esistono numerosi geni *AtIDD* la cui mutazione è associata a un ritardo di fioritura sebbene meno severo di quello osservato nelle monocotiledoni (Colasanti *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2011).

1.10.4. Il putativo florigeno di mais, ZCN8 e il suo putativo paralogo ZCN7

In numerose specie vegetali sono stati identificati orologi a *FT* di *Arabidopsis*, il putativo ormone vegetale in grado di indurre la fioritura, come *SST* (*SINGLE FLOWER TRUSS*) di pomodoro (Lifschitz e Eshed, 2006; Lifschitz *et al.*, 2006), *TaFT* di frumento (Yan *et al.*, 2006), *HvFT* di orzo (Faure *et al.*, 2007), *BvFT2* della barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris*) (Pin *et al.*, 2010) e *HaFT1/HaFT4* di girasole (*Helianthus annuus*) (Blackman *et al.*, 2010).

L'identificazione di geni che codificano per uno o più florigeni in mais è di particolare importanza per la comprensione del meccanismo di fioritura in questa importante pianta modello e specie agronomica, con conseguente applicabilità ai programmi di miglioramento genetico (vedere paragrafo 1.11).

È necessario ricordare che il mais è un allotetraploide, derivante dalla duplicazione dell'intero genoma (Gaut e Doebley, 1997), pertanto, non è da escludere l'esistenza di più proteine in grado di svolgere entrambe il ruolo di florigeno. L'identificazione di un putativo florigeno di mais è stata resa difficile dalla vastità della famiglia di proteine PEBP (Danilevskaya *et al.*, 2008a).

Tra i 25 membri di questa famiglia, denominati *ZCN* (*Zea mays CENTRORADIALIS*), *ZCN8* è stato identificato come la probabile proteina florigenica di mais (Danilevskaya *et al.*, 2008a). Esiste un altro gene, denominato *ZCN7*, che ha un'elevata similarità di sequenza con *ZCN8* (vedere i dati precisi riportati nell'articolo di Mascheretti *et*

al., 2013), ma che a differenza di *ZCN8* sembra non produrre un mRNA correttamente processato (Danilevskaya *et al.*, 2008a).

Oltre a mostrare un'elevata similarità aminoacidica con *AtFT*, *ZCN8* è l'unico membro della famiglia *ZCN* per il quale è stata dimostrata un'interazione diretta con *DLF1* (Danilevskaya *et al.*, 2008a). *ZCN8*, inoltre, mappa nelle vicinanze del locus *Vgt2*, QTL associato alla variazione del tempo di fioritura in mais (Chardon *et al.*, 2005; Coles *et al.*, 2010).

Nel mais, *ZCN8* è prodotto nella parte fotosinteticamente attiva della foglia (Figura 20). In particolare, a partire dallo stadio V4, il suo trascritto si accumula a livello dei fasci vascolari del floema delle foglie mature, raggiungendo un picco in corrispondenza della transizione florale (Meng *et al.*, 2011). Man mano che la transizione florale ha luogo, il trascritto di *ZCN8* si accumula anche a livello del parenchima dello xilema e nelle cellule dello sclerenchima, dove tuttavia la sua funzione è ancora da chiarire (Meng *et al.*, 2011). La localizzazione a livello dei fasci vascolari del floema consentirebbe invece alla proteina *ZCN8* di migrare facilmente verso il meristema apicale, sebbene tale movimento non sia ancora stato direttamente dimostrato. È stato osservato che l'espressione ectopica di *ZCN8* nel meristema apicale durante la fase vegetativa promuove la transizione florale e che, al contrario, la sotto-espressione del trascritto di *ZCN8* correla con un ritardo di fioritura, portando ulteriori evidenze dell'attività florigenica di *ZCN8* in mais (Meng *et al.*, 2011). Inoltre, *ZCN8* sembra essere richiesto, non solo per la transizione florale, ma anche per promuovere un generale arresto di crescita. Infatti, le piante

transgeniche non esprimenti *ZCN8* producono foglie più larghe rispetto alla pianta selvatica (Danilevskaya et al. 2011).

A differenza di quanto osservato nelle linee temperate di mais, nelle quali l'espressione di *ZCN8* non mostra alcun andamento dipendente dai ritmi circadiani, nelle linee tropicali di mais, come il teosinte, si assiste ad un picco di espressione di *ZCN8* in corrispondenza di fotoperiodo induttivo caratterizzato da giorni corti e ad un'attenuazione della sua trascrizione in presenza di giorni lunghi. Tale osservazione suggerirebbe l'esistenza di un possibile effetto regolatorio di *ZCN8* da parte del fotoperiodo nelle linee tropicali di mais, fenomeno peraltro già osservato in riso (Komiya *et al.*, 2009, Figura 21).

È interessante continuare ad investigare per comprendere in che modo l'espressione e l'attività di *ZCN8* siano diversamente regolate tra le linee di mais sensibili al fotoperiodo e le linee di mais temperate (ND) sia dal punto di vista evuzionistico sia per una possibile applicabilità nel miglioramento genetico del mais.

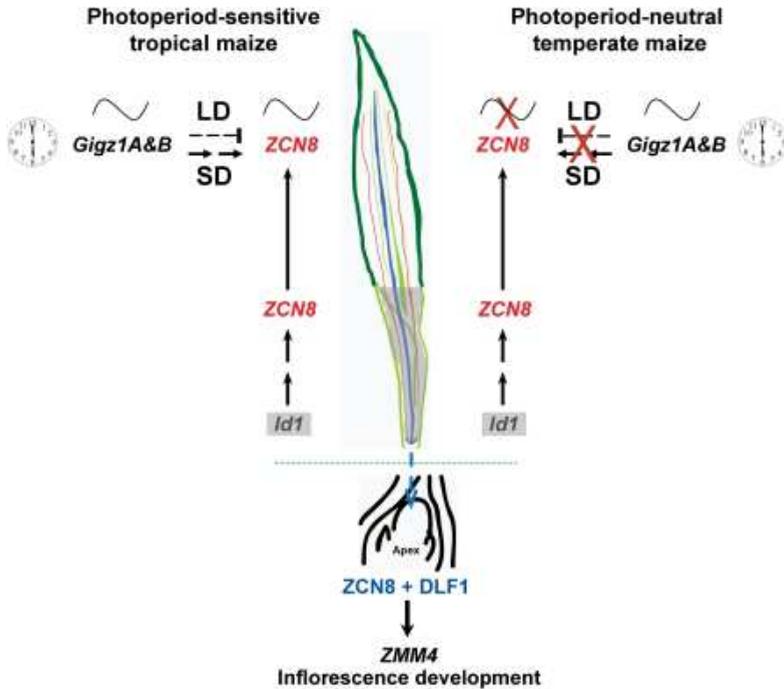


Figura 21 – Modello di regolazione di ZCN8 da parte di Id1 e del pathway del fotoperiodo. Nel teosinte e nei mais tropicali l'espressione di ZCN8 è indotta da SD ed attenuata da LD, come già osservato in riso (Komiya *et al.*, 2009). Nei mais temperati, al contrario, sebbene il pathway circadiano sembri intatto, l'espressione di ZCN8 non dipende dal fotoperiodo e mostra, pertanto, un andamento costante. Sebbene *Id1* e *ZCN8* siano temporalmente e spazialmente espressi in maniera distinta, *Id1* è in grado di indurre l'espressione di *ZCN8*. *ZCN8* migra poi attraverso il floema, verso il meristema apicale (freccia arancione) dove interagisce con DLF1 per attivare i geni responsabili della transizione fiorale, come *ZMM4* (tratto da Lazakis *et al.*, 2008).

1.10.5. Regolazione di *ZCN8* mediata da *Id1*

La natura del segnale che controlla l'espressione di *ZCN8* nelle foglie mature di mais resta da chiarire.

In *Arabidopsis*, è noto che questo ruolo è svolto da *CO*, che fungendo da sensore del fotoperiodo, è in grado di attivare direttamente l'espressione di *FT* (Turck *et al.*, 2008). In mais, sebbene sia stato identificato l'omologo di *CO*, *CONZI*, un suo ruolo diretto nell'attivazione di *ZCN8*, nel mais tropicale sensibile al fotoperiodo, è ancora da dimostrare. È stato invece osservato che nei mutanti *id1*, introgressati nel "background" di B73, una linea *inbred* temperata, l'assenza del gene *INDETERMINATE1* funzionante correla con una riduzione dell'espressione di *ZCN8*, supportando l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo regolatorio *Id1-ZCN8* nelle foglie di mais temperato. Infatti, sebbene il florigeno sia stato inizialmente identificato come una molecola in grado di indurre la transizione fiorale in risposta ai segnali provenienti dal fotoperiodo, è stato dimostrato che esso è coinvolto nella trasmissione di segnali che inducono la fioritura anche in piante day-neutral, come la linea di mais temperato B73 (Lazakis *et al.*, 2011). È importante ricordare che l'espressione di *Id1* e *ZCN8* sono temporalmente e spazialmente distinte (Figura 20), pertanto, *Id1* non può essere il diretto responsabile della produzione del mRNA di *ZCN8* nella foglia matura. Una prima spiegazione del possibile ruolo regolatorio svolto da *Id1*, si basa sull'ipotesi che esso, espresso nella porzione basale della foglia, regoli la produzione di un segnale mobile che, migrando verso la parte matura della foglia, attivi l'espressione di *ZCN8* (Colasanti e Coneva,

2009). Una seconda ipotesi considera che Id1 svolga la sua funzione mediante meccanismi epigenetici. Specificamente, Id1 potrebbe essere responsabile della formazione, a livello del locus *ZCN8* e in stadi precoci dello sviluppo fogliare, di uno stato di cromatina trascrizionalmente competente. Tale stato sarebbe poi mantenuto nel corso dello sviluppo della foglia, con lo scopo di favorire un'efficace e veloce produzione di mRNA di *ZCN8* nella foglia matura. In pratica, si tratterebbe di un meccanismo simile, sebbene con effetti opposti, a quanto descritto per *FLC* di *Arabidopsis* a seguito della repressione di questo gene mediata dalla vernalizzazione (Swiezewski *et al.*, 2009). L'ipotesi della regolazione epigenetica del florigeno è sostenuta da studi svolti in *Arabidopsis*, che hanno dimostrato come l'espressione di *FT* e di *TSF* sia effettivamente soggetta a una modulazione della trascrizione a seguito di modifiche della cromatina. (Adrian *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Inoltre, la possibilità che Id1 moduli l'espressione di *ZCN8* mediante meccanismi epigenetici è sostenuta da evidenze preliminari, che hanno dimostrato la capacità della proteina Id1 di interagire con diverse proteine coinvolte in meccanismi di modificazione del DNA mediata da RNA e di modificazione della cromatina (Joseph Colasanti, comunicazione personale).

1.11. Il segnale florigenico e la regolazione della fioritura: possibili applicazioni nel miglioramento genetico dei cereali

La manipolazione della transizione fiorale nei cereali e nelle piante di interesse agronomico, potrebbe avere dei profondi impatti negli studi di miglioramento genetico e nella produttività.

Il florigeno è un segnale mobile che, attraverso il floema, migra verso il meristema apicale dove induce la transizione fiorale.

Una tecnica emergente, denominata *VIRUS-INDUCED FLOWERING* (VIF) prevede di infettare una pianta con un virus disarmato esprime il florigeno, promuovendo in questo modo la transizione fiorale a un determinato stadio di sviluppo, senza dover aspettare che il fenomeno avvenga naturalmente (Figura 22a) (McGarry e Ayre, 2013; Yamagishi *et al.*, 2011; Yamagishi e Yoshikawa, 2010).

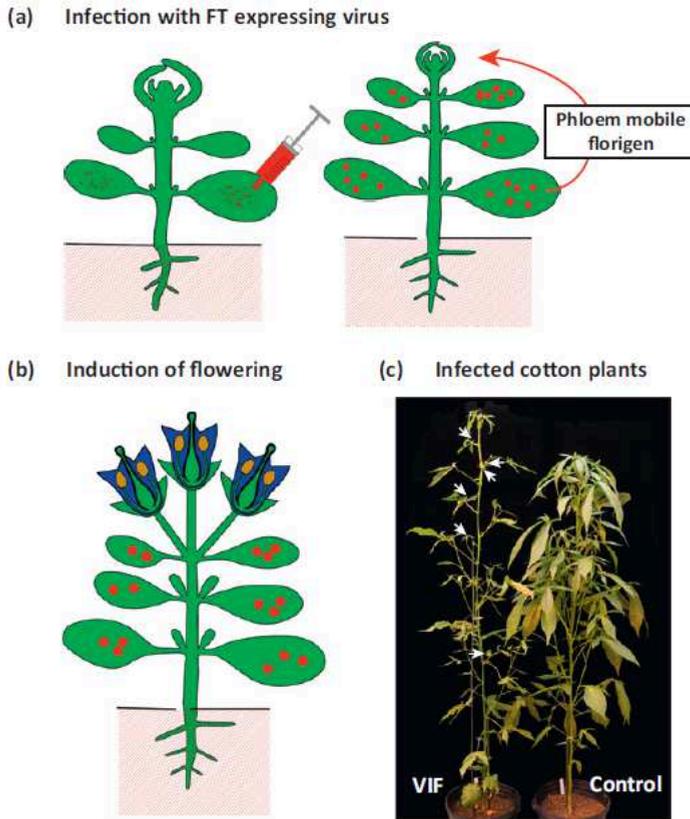


Figura 22 – Virus-induced flowering (VIF). (A) Un virus disarmato, ingegnerizzato per esprimere FT, è utilizzato per inoculare la piante (a sinistra). Il florigeno viene espresso nella pianta e l’infezione mantenuta (a destra). (B) Sia il virus che il florigeno sono segnali mobili, pertanto, migrano al SAM dove attivano la transizione fiorale (a sinistra). A destra è mostrata l’accessione Texas 701 di cotone (*Gossypium hirsutum*) infettata con il virus e il controllo. Entrambe le piante sono state cresciute in presenza di fotoperiodo non-induttivo e solo la pianta infettata mostra l’emissione di boccioli fiorali (tratto da McGarry e Ayre, 2012).

In questo modo la pianta fiorisce indipendentemente dal fotoperiodo e dal suo *status* fisiologico. Inoltre, il virus non viene trasmesso alle

generazioni successive, pertanto, i discendenti della pianta infettata non sono considerati piante transgeniche (Figura 22b).

Poiché è stato osservato che FT e i suoi orologi sono in grado di promuovere la transizione fiorale in diverse specie vegetali, non è necessario clonare il florigeno specifico per la pianta che si vuole infettare.

Un interessante esempio di applicazione di questa tecnica è il cotone (*Gossypium hirsutum*), una pianta perenne fotoperiodo-dipendente, la cui produzione si basa su un numero ristretto di accessioni addomesticate caratterizzate da una scarsa variabilità genetica. La coltivazione del cotone è, di conseguenza, geneticamente vulnerabile con conseguenze drastiche sulla sua produttività (Paterson *et al.*, 2004). Le accessioni ancestrali di *Gossypium hirsutum* sono una fonte di variabilità genetica non sfruttata, poiché la differenza, in termini di dipendenza dal fotoperiodo e di altre condizioni ambientali, pone non pochi limiti all'introggressione di tale variabilità nelle specie addomesticate (Guo *et al.*, 2008; Mauney e Phillips, 1963), confinando la coltivazione del cotone in zone tropicali o in strutture dedicate.

La tecnica VIF rende la fioritura indipendente dal fotoperiodo, accelerando la transizione fiorale nel cotone ancestrale, fornendo un'opportunità unica di miglioramento genetico del cotone addomesticato (McGarry e Ayre, 2012). Tale tecnica potrebbe essere, infatti, sfruttata per inserire nel germoplasma di cotone caratteristiche genetiche nuove, accelerando i programmi di miglioramento genetico. Inoltre, le piante di cotone infettate con VIF mostrano una sincronia

maggiore tra fioritura e fruttificazione rispetto alle piante non trattate, qualità altamente desiderata dai produttori di cotone (Figura 22c).

La tecnica VIF può essere utilizzata, in un prossimo futuro, per promuovere la fioritura e accelerare i programmi di miglioramento genetico anche in altre piante o cereali come la canna da zucchero e il mais, rendendo la loro fioritura meno dipendente dall'ambiente esterno (McGarry e Ayre, 2012).

Scopo della tesi e strategia sperimentale

Studi effettuati sulla pianta modello *Arabidopsis* hanno dimostrato che i meccanismi epigenetici svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della fioritura. Inoltre, la fisiologia della fioritura e la sua regolazione avvengono secondo meccanismi che sono conservati, sebbene parzialmente, tra *Arabidopsis* e altre piante di interesse agronomico, come il mais. ***Poiché finora non è stato condotto nessuno studio per caratterizzare il ruolo svolto dai meccanismi epigenetici nella regolazione della fioritura in mais, lo scopo della mia tesi è stato di analizzare il ruolo che tali meccanismi giocano nella regolazione della fioritura in mais, al fine di identificare eventuali peculiarità rispetto a quanto noto finora in Arabidopsis.***

Tutti gli studi sono stati condotti utilizzando la linea di mais temperato B73 (piante selvatiche e piante mutanti, ma comunque introgredite nel “background” genetico di B73), la cui fioritura è regolata quasi esclusivamente dal *pathway* autonomo. Le informazioni che derivano da questo studio possono essere applicate, pertanto, soltanto alle linee temperate di mais, tra le quali troviamo numerosi ibridi utilizzati in agricoltura.

Per il raggiungimento dell’obiettivo sono state utilizzate due strategie sperimentali.

La prima strategia è stata utilizzata per verificare se anche in mais i meccanismi epigenetici svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della fioritura. Tale strategia consiste nell’utilizzo di mutanti di epi-regolatori, cioè di piante nelle quali l’attività di

specifici epi-regolatori risulta alterata artificialmente. Nello specifico, abbiamo utilizzato le linee che sotto-esprimono i geni *nfc101* e *nfc102*, due paraloghi che codificano per proteine WD-repeat, componenti di numerosi complessi coinvolti nella formazione e nel rimodellamento della cromatina. I geni *nfc101/nfc102* mostrano omologia con il gene *FVE* di *Arabidopsis*, regolatore chiave del *pathway* autonomo di fioritura e noto per svolgere un importante ruolo in diversi complessi che modificano la cromatina. Durante il mio lavoro, sono stati utilizzati questi mutanti perché all'inizio del progetto AENEAS, a cui fa riferimento il mio lavoro di tesi, erano disponibili linee di mutanti indipendenti solo per i geni *nfc101* e *nfc102*.

La seconda strategia sperimentale ha previsto l'utilizzo dei mutanti nulli *id1*, regolatore chiave della fioritura in mais. Come esposto nell'Introduzione, esistevano già, prima dell'inizio del mio lavoro, delle ipotesi che suggerivano il coinvolgimento di *Id1* in meccanismi epigenetici volti a regolare l'espressione dei florigeni. Durante il mio lavoro, abbiamo cercato di investigare quali sono i meccanismi epigenetici attraverso i quali *Id1* agisce nel regolare la fioritura in mais.

A seguito degli obiettivi posti, lo scopo del mio lavoro può dirsi raggiunto perché è stato dimostrato, per la prima volta in mais, che i meccanismi epigenetici sono coinvolti nella regolazione di geni che svolgono un ruolo importante nella fioritura. Inoltre, i dati emersi da questo studio indicano che, sebbene alcuni meccanismi epigenetici

che regolano la fioritura in mais siano conservati rispetto all'*Arabidopsis*, il mais mostra, tuttavia, delle peculiarità.

Per concludere, voglio sottolineare che, avendo raggiunto lo scopo prefissato per questo lavoro, adesso si dispone di almeno alcune delle informazioni che sono necessarie se si vuole procedere con i processi di “manipolazione” della fioritura in piante di mais. In questo lavoro vengono, infatti, identificati dei putativi candidati che possono costituire il “bersaglio” dei processi di manipolazione della fioritura attuati dall'uomo, mediante metodologie di miglioramento “classiche” o basate sulle biotecnologie.

Materiali e Metodi

3.1. Genotipi utilizzati

3.1.1. Generazione delle linee transgeniche *nfc101/nfc102*

Per le analisi fenotipiche dei mutanti *nfc101/nfc102* e per la caratterizzazione funzionale dei geni, furono generati nel laboratorio del dottor Vincenzo Rossi (CRAMAC Bergamo) linee transgeniche di mais che esprimono costitutivamente il trascritto antisenso di *nfc102* (piante denominate AS) (per maggiori dettagli vedere Mascheretti *et al.*, 2013).

Per minimizzare l'effetto del "background" genetico, tali mutanti furono introgressati quattro volte nella linea di mais B73 e, in seguito, le piante eterozigoti per la presenza del transgene furono autoimpollinate per ottenere piante omozigoti per la presenza del transgene e piante selvatiche (*wild-type*). Le piante omozigoti furono nuovamente autoimpollinate e le piante ottenute furono utilizzate per le analisi fenotipiche e molecolari (Figura 1).

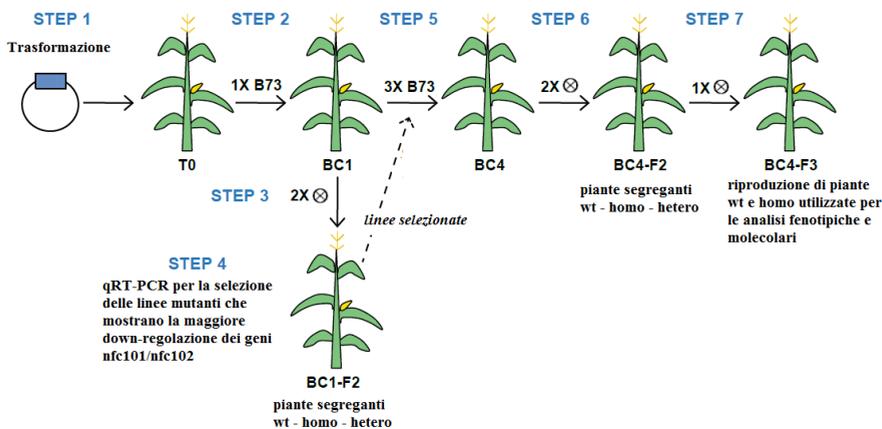


Figura 1 – Rappresentazione schematica del procedimento che ha consentito l’ottenimento dei mutanti omozigoti, eterozigoti e selvatici per l’espressione dei geni *nfc101/nfc102* di mais. (tratto da Rossi *et al.*, 2007).

Un’altra linea transgenica di mais (R102), ottenuta mediante la tecnica dell’RNA interfering, la quale esprime costitutivamente il transgene RNAi di *nfc102*, è stata ottenuta dal Plant Chromatin DB USA initiative (<http://www.chromdb.org>; stock number: 3480.04) che l’ha depositata presso il Maize Genetic Stock Center.

Dalle piante AS e dalla linea R102 sono state selezionate 4 linee che mostrano l’effetto maggiore rispetto allo sotto-espressione di *nfc101* e *nfc102*. Nello specifico, le linee selezionate per le analisi molecolari svolte in questo lavoro sono: AS15, AS36, AS63 e R102. La linea R102 è quella che mostra una maggiore riduzione dei trascritti *nfc101* e *nfc102* (Figura 2; vedere anche Figura 1 in Informazioni supplementari)

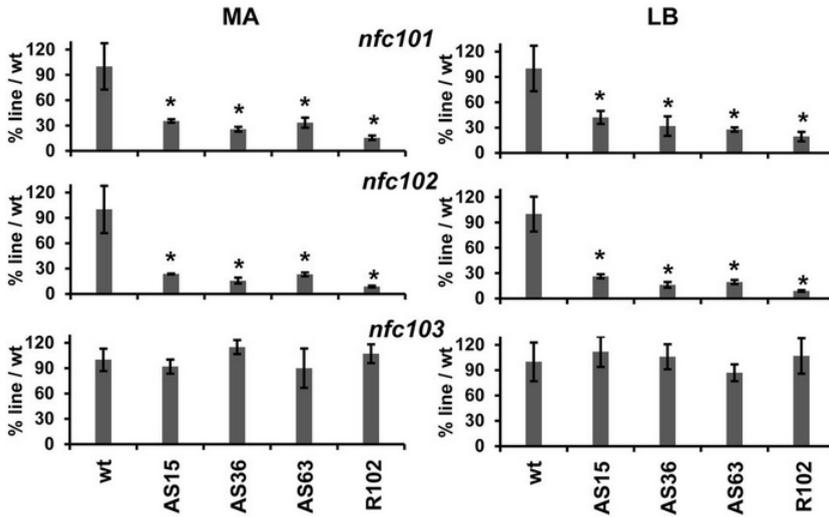


Figura 2 – Differenze di espressione dei geni *nfc* nei mutanti *nfc101/nfc102*. Quantificazione mediante qRT-PCR dei trascritti *nfc101*, *nfc102* e *nfc103* nelle quattro linee transgeniche e nella linea selvatica. Il diagramma a barre rappresenta il valore medio del livello di mRNA ottenuto da due differenti preparazione di cDNA e da tre repliche di PCR per ogni preparazione. È riportata la barra degli errori. I livelli di ciascun trascritto sono stati normalizzati sul trascritto del gene *gapc2*, la cui espressione è inalterata nelle linee mutanti. L'asterisco indica una variazione statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) nelle linee *nfc101/nfc102* rispetto alla linea selvatica. Il livello del trascritto del gene *nfc103* è inalterato nei mutanti *nfc101/nfc102*, indicando che in essi avviene specificatamente la sotto-espressione dei geni *nfc101* e *nfc102* e non di altri geni *nfc*.

3.1.2. Alterazioni fenotipiche nei mutanti *nfc101/nfc102*

Allo scopo di valutare l'effetto della sotto-espressione dei geni *nfc101* e *nfc102* sullo sviluppo e sulla fioritura della pianta di mais, prima dell'inizio del mio dottorato, sono state eseguite delle analisi di vari fenotipi

L'analisi è stata condotta utilizzando le linee transgeniche indipendenti (AS15, AS36, AS63 e R102) introgredite diverse volte nel "background" B73. I fenotipi misurati su varie piante di ognuna delle 4 linee mutanti sono stati comparati con i fenotipi misurati nelle piante "controllo". Come piante "controllo" sono state utilizzate piante selvatiche segreganti, ottenute nel corso dell'introgresione (segreganti di BC4-F3, vedere Figura 1) e piante selvatiche della linea *inbred* B73. Un tratto fenotipico è stato considerato alterato nella linea transgenica solo se esso mostrava una variazione statisticamente significativa rispetto ai controlli (sia segregante BC4-F4 che B73) per 3 delle 4 linee analizzate. Le analisi indicano che la sotto-espressione dei geni *nfc101* e *nfc102* è associata a diversi difetti di sviluppo. Nei mutanti si osserva, ad esempio, una diminuzione del numero di semi germinati, una riduzione del peso della pianta giovanile e adulta e un ritardo nell'emissione sia dell'infiorescenza femminile sia maschile (Mascheretti *et al.*, 2013). Non si riscontra, tuttavia, alcuna variazione nel numero di foglie prodotte dalla pianta a maturità, indicando che il ritardo di fioritura non è imputabile a un ritardo nel compimento della transizione dalla fase vegetativa alla fase riproduttiva, bensì sembra essere dovuto a un generale ritardo nello sviluppo morfologico della pianta transgenica rispetto al controllo (Mascheretti *et al.*, 2013; Figura 3a). Al momento della transizione fiorale (Irish e Nelson, 1991), infatti, non si evincono differenze morfologiche a livello del meristema apicale tra i mutanti e i controlli, indicando che la transizione fiorale avviene normalmente, nonostante la mutazione nei

geni *nfc101e nfc102* (Figura 3b; per maggiori dettagli vedere Mascheretti *et al.*, 2013)

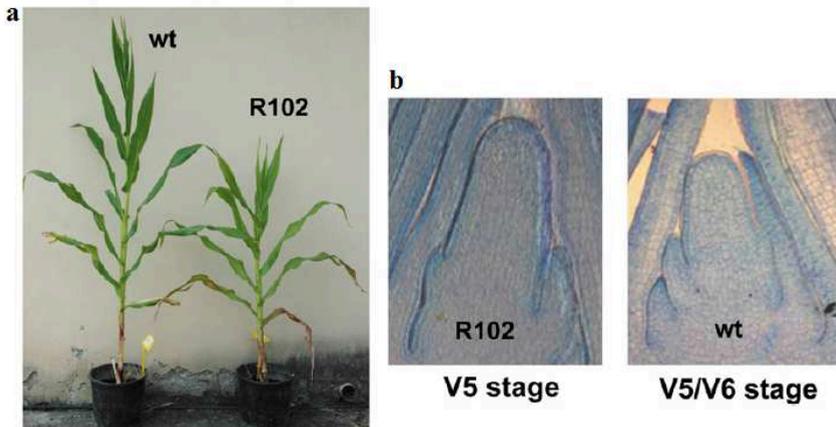


Figura 3 – Alterazioni fenotipiche nei mutanti transgenici *nfc101/nfc102*. **(a)** Esempio di fenotipo visibile nel mutante R102, che mostra un ritardo di crescita rispetto alla pianta selvatica. **(b)** Immagini al microscopio di una sezione longitudinale del SAM nelle piante selvatiche e nelle piante mutanti R102. La durata della transizione fiorale, valutata in base alla lunghezza del meristemo apicale e alla comparsa di ramificazioni laterali in piante campionate allo stesso stadio di sviluppo, non è alterata nei mutanti R102 rispetto alla pianta selvatica.

Questi risultati suggeriscono, pertanto, che il ritardo di fioritura osservato nelle piante mutanti *nfc101/nfc102* è causato da una crescita più lenta, che porta alle variazioni fenotipiche osservate, compreso un ritardo nella comparsa delle infiorescenze.

In generale, si può affermare inoltre che la ridotta espressione dei geni *nfc101* e *nfc102* induce nei mutanti diverse variazioni fenotipiche,

indicative di effetti pleiotropici che determinano un generale ritardo di sviluppo della pianta.

3.1.3. Mutanti *id1*

I mutanti *id-m1* sono stati ottenuti mediante l'inserzione del trasposone *Ds2* nella regione terminale del terzo esone del gene *Id1* di mais (allele mutante *id1-m1*) (Figura 7 in Informazioni suppl.).

Essi sono stati introgressi dieci volte nella linea *inbred* B73 di mais (Colasanti *et al.*, 1998).

Allo stadio di due foglioline emerse, le piante sono state genotipizzate per *Id1* utilizzando i primer IdF, IdR4 e DsR in PCR, come descritto da Wong e Colasanti (2007) e le cui sequenze sono le seguenti: IdF: 5' – AGAGCTCTGGGGGACTTGACTG – 3', IdR4: 5' – CTAGGTTTTCTCTCGATCCGTCCG – 3'; DsR: 5' – GAGGTATTTTACCGACCGTTCCCG – 3'.

3.2. Condizioni di crescita delle piante e tessuti utilizzati per le analisi molecolari

Tutte le piante utilizzate in questo studio derivano da semi trattati con conciante (Irol plus) per attenuare l'insorgenza di funghi e pre-germinati 72 ore in piastra Petri, nella quale sono stati disposti due fogli circolari di carta 3M imbevuti con 10 ml circa di terreno Murashige & Skoog (Micropoli) precedentemente autoclavato.

I semi così pre-germinati sono stati seminati ad una profondità di circa 2 cm in una miscela 3:1 di terriccio (Compo Sana, terriccio universale con riserva d'acqua) e sabbia.

Le piante sono state fatte crescere in fitotrone con un ciclo giornaliero di 17 ore di luce a 27°C e 7 ore di buio a 22°C.

DNA, RNA e cromatina, utilizzati per le analisi molecolari, sono stati estratti da un minimo di 10 semi cresciuti fino allo stadio di sviluppo V3/V4 (terza e quarta foglia completamente estese, per le quali è visibile il collare). Per la linea di mais temperato B73, tale stadio di sviluppo precede la transizione florale, che avviene solitamente allo stadio V5 (Meng *et al.*, 2011).

Le piante mutanti *nfc101/nfc102* e selvatiche per i geni *nfc101/nfc102* sono state dissezionate manualmente mediante l'ausilio di un bisturi per ottenere i materiali denominati LB (leaf blade) e MA (meristematic enriched area) (Figura 3).

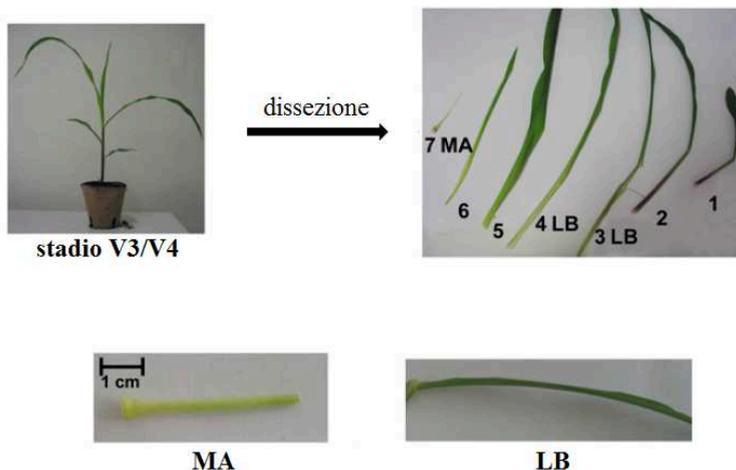


Figura 3 – Rappresentazione fotografica dei tessuti utilizzati nelle analisi fenotipiche e molecolari delle piante mutanti *nfc101/nfc102* e delle piante selvatiche per i geni *nfc101/nfc102*. I tessuti MA e LB sono stati dissezionati da piante allo stadio di sviluppo V3/V4.

Il materiale denominato LB è costituito dalla terza e dalla quarta foglia, private della base e dell'apice. Il materiale MA è costituito da 4 cm della settima foglia più interna (misurati a partire dalla base della settima foglia più interna), materiale che racchiude il SAM e le foglioline primordiali attorno ad esso.



Figura 4 – Fotografie che illustrano come è stato ottenuto il tessuto corrispondente alla foglia immatura dalle piante mutanti *idl* e dalle piante selvatiche per il gene *Id1*. Le piante, cresciute fino allo stadio di sviluppo V4/V5, sono state dissezionate manualmente (Figura 4a). La settima foglia, non completamente estesa costituisce il tessuto fogliare maturo. Dalla pianta, privata delle prime 7 foglie, incluse le guaine, è stata eliminata la parte basale e sono stati misurati 12 cm a partire dalla base, che costituiscono il materiale denominato foglia immatura (Figura 4b).

Allo stadio di sviluppo V4/V5 le piante mutanti *idl-ml* e le piante selvatiche per il gene *id* sono state dissezionate manualmente

mediante l'ausilio di un bisturi nel laboratorio del prof. Joseph Colasanti dell'Università di Guelph, Ontario (Canada). Da esse è stata prelevata la settima foglia (materiale denominato "foglia matura"), che costituisce approssimativamente lo stesso tessuto indicato da Lazakis *et al.*, (2011) per lo studio dell'espressione di *ZCN8* e di *ZCN7* nei mutanti *idl*, e l'ottava foglia più interna, privata del meristema apicale (SAM), materiale denominato "foglia immatura" (Figura 4), tessuto nel quale si ha l'espressione di *Idl*.

3.3. Estrazione di RNA totale

L'RNA totale è stato purificato dai tessuti indicati con il protocollo Trizol di Life Technologies. I campioni sono stati finemente macinati con azoto liquido e omogenati per circa 5 minuti in Trizol freddo seguito da quattro estrazioni con cloroformio freddo. L'RNA è stato risospeso in acqua deionizzata sterile. La qualità dell'RNA e la sua concentrazione sono state stimate mediante spettrofotometro. Quando indicato, la frazione di RNA poliadenilato è stata purificata dall'RNA totale mediante il kit Oligotex mRNA (Qiagen).

3.4. Sintesi del cDNA

Prima della sintesi del cDNA, l'RNA totale estratto è stato trattato con TURBO DNA-free DNasi (Ambion) per rimuovere i residui di DNA genomico. La sintesi del cDNA è stata fatta utilizzando 2 µg di RNA trattato con la DNasi e con l'enzima trascrittasi inversa Superscript III (Life Technologies), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Per la sintesi di cDNA mediante *primer* ad oligo(dT), la reazione è stata

condotta utilizzando 500 ng di oligo(dT)₁₇ in un volume finale di 500 µl.

Per la sintesi di cDNA mediante random hexamer (Sigma-Aldrich), la reazione è stata condotta utilizzando 250 pmoli di random hexamer in un volume finale di 20 µl. Entrambe le reazioni sono state incubate un'ora a 50°C.

Per la sintesi di strand specific cDNA, la reazione è stata condotta utilizzando 2 pmoli del *primer* specifico in un volume finale di 20 µl. La reazione è stata incubata 45 minuti a 55°C.

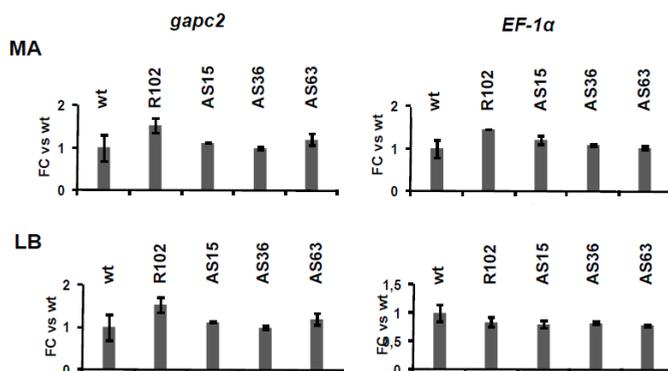


Figura 5 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti dei geni *gapc2* e *EF-1α* rispettivamente nei tessuti MA e LB, di piante mutanti *nfc101/nfc102* e di piante selvatiche BC4-F3 cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA dei rispettivi geni, normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da sei repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello del trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard.

I *primer reverse* per la sintesi del cDNA della *gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi2* (*gapc2*) e di *EF-1 α* , prodotti dal filamento di RNA senso, sono stati aggiunti a tutte le reazioni di sintesi di cDNA per permettere la normalizzazione dei dati di qRT-PCR. I trascritti di *gapc2* e di *EF-1 α* possono essere utilizzati per la normalizzazione dei dati poiché la loro espressione non subisce variazioni nei mutanti *nfc101/nfc102* rispetto al controllo (Figura 5).

Le sequenze dei *primer* specifici utilizzati per la sintesi degli *strand specific* cDNA sono riportate nella Tabella 1. Come controllo negativo, sono state condotte in parallelo delle reazioni di sintesi del cDNA nelle quali è stato omesso l'enzima trascrittasi inversa Superscript III.

Come controllo negativo delle reazioni di sintesi di *strand specific* cDNA è stata condotta in parallelo una reazione di sintesi del cDNA nella quale è stato aggiunto l'enzima Superscript III, ma nella quale è stato omesso il *primer* specifico.

Tabella 1 – Lista dei *primer* utilizzati per la sintesi del cDNA strand specific.

a: orientamento del filamento di RNA utilizzato come template nella reazione di sintesi del cDNA.

b: sequenza del *primer* indicata in orientamento 5'-3'.

Nome del <i>primer</i>	Filamento di RNA ^a	Sequenza del <i>primer</i> ^b
GAPC2rev	senso	TTCATGTGGCGGATCAGGTCGA
EF-1αrev	senso	CAGAGATTGGAACGAAGTGG
ZCN8for	antisenso	GCAACGGCCAATACCATTAG
ZCN8rev	senso	ATTATTGATGATATTTCTATAGTGTGA
ZCN7for	antisenso	GTAAAAAATCATGCTTTGACAAAG
ZCN7rev	senso	ATTATTGATGATAATTATATAGTGTAG
CRM2LTRfor	antisenso	TCGTCAACTCAACCATCAGGTGAT
CRM2LTRrev	senso	GCAAGTAGCGAGAGCTAAACTGA
MuTIRfor	antisenso	GGGATTTCGACGAAATGGAGGC
MuTIRrev	senso	GCGCAGGCGAACGGTAAACG
Cin/ZeonLTRfor	antisenso	CGCCGAAGGTCTTCTAGGAA
Cin/ZeonLTRrev	senso	GGAGACTCGTTCTCAAGTGCTA
Prem2/JiLTRfor	antisenso	ACATTTGGTGGTTGGGGCTA
Prem2/JiLTRrev	senso	GGGTGAATAGGGCGAAACTGAA

3.5. Reazioni di RT-PCR

I cDNA prodotti nelle reazioni di trascrizione inversa, descritti nel paragrafo 3.4, sono stati utilizzati come template nelle reazioni di RT-PCR.

Le sequenze dei *primer* utilizzati e le rispettive regioni amplificate sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 2 – Lista delle sequenze analizzate e dei rispettivi *primer*.

a: tra parentesi è riportato il numero identificativo del gene, preso da GeneBank. Fanno eccezione le sequenze dei TE, per i quali è riportato il Accession number.

b: sequenza del *primer* indicata in orientamento 5'-3'. F: *primer* forward; R: *primer* reverse.

Sequenza e regione amplificata ^a	Esperimento	<i>Primer</i> combination ^b
FLCP128/ZMM4 (542041) Trascritto	RT-PCR	F CTTATGGTCGAGTCAATTCAGC R GCTGCCACAGGGAAGATGCTGAC
FLCP109/ZMM15 (542032) Trascritto	RT-PCR	F AACCAGGAAGAACCAACTTATGC R GCTGCTGCACCTTCCACCAA
FLCP101/ZAP1 (542257) Trascritto	RT-PCR	F CAACTAGAGCAGCAGCTGG R GCACAGCAACCATATGGTACG
FLCP102/ZMM21 (542035) Trascritto	RT-PCR	F GGAATTGCACCGAATGGAAA R AGACGACTGCCCGTCTTCAG
FLCP103/ZMM26 (542044) ^e		
FLCP106/ZMM19 (542033) Trascritto	RT-PCR	F CCAGTTCGCCAGCTCCAGTA R TGAGTCGAAGGCTTGCTTCC
FLCP104/Mads2 (41764) Trascritto	RT-PCR	F ATTCGCCAAGAAAATGATGAG R AAAGTTGAATGGAGTCGGTGA

FLCP105/ZMM20 (194693937) e FLCP130 (AJ430634) Trascritto	RT-PCR	F CGGCAAACCTCTTCCACTTCG R CGTCTCCATCCTCGACATCC
FLCP107 (542325) Trascritto	RT-PCR	F CTGCCAACAATAACCCCTCATC R GCAATAAGCAAGGTCATGGAA
FLCP108/ZMM5 (542042) Trascritto	RT-PCR	F CGGATGGCCTGTCAAAGAGA R GTGACCGTCCTCCACGTTGT
FLCP110/ZMM27 (42506) Trascritto	RT-PCR	F TTGGCAATGGTTTGTTCCTTC R GTAGCCATGTTGGCATGAAGT
FLCP111/ZAG1 (542244) Trascritto	RT-PCR	F ATTGGACCTCTCAAGCTTCAG R ATATGACCACCGCCATCCAC
FLCP112/ZMM31 (542040) Trascritto	RT-PCR	F ACATGAACCAGCAGCCAGA R ATCTCTGAAGGACACGGCACT
FLCP113/ZMM28 (542045) Trascritto	RT-PCR	F CTGAGTCTGAACCGTCTCCTG R GGGGCCTGACTTTATTGGTAG
FLCP114/ZMM25 (542039) Trascritto	RT-PCR	F GGACAGCTAAGGTAAGGCACA R GCGGATCTACCCCTTATTTTCT
FLCP115/ZMM6 (542043) Trascritto	RT-PCR	F TGCATGACCACCTTCCTG R TCCAAGCACAACGTATAGCAC
FLCP117/ZMM7 (542456) Trascritto	RT-PCR	F GCACTCTTCACCACAGCAAG R TGCATCGCATCTTTATTTATTCC
FLCP118/ZMM24 (542038) Trascritto	RT-PCR	F TGGATGTCTTAGCCAGTGCTT R CCATGTGGTCATTTGGACAG
FLCP120/ZMM3 (100415939) Trascritto	RT-PCR	F AGTGGATCTAGTGGGCATGGT R TACCTATATGCAGCGAAGGA
FLCP121/ZMM14 (541985) Trascritto	RT-PCR	F CAAGAAACAAGGCCAGAGAAC R AGCTGATCCATGTAGGCTTGA
FLCP123/ZAG3 (542256) e FLCP124/ZAG5 (542709) Trascritto	RT-PCR	F ATGGACTGTGAACCCACTCTG R GGCTCCTGGGATATTATTGG

FLCP122/ZMM8 (542457) Trascritto	RT-PCR	F CAAGAAACAAGGCCAGAGAAC R AGCTGATCCATGTAGGCTTGA
FLCP127/Mads3 (541765) Trascritto	RT-PCR	F CAACTAGAGCAGCAGCTGG R TCGCACGCCATTTGCTCGC
dfl1 (100037791) Trascritto	RT-PCR	F CGATGGTGAGGAAGACCCTGCA R CGCCATGGCAGGAAGGATTTGC
id1 (541693) Trascritto	RT-PCR	F GAGCTCTGGGGGACTTGACTG R CTACGACGACAGGAGGAGGAGA
ZCN8 (100127519) Trascritto senso processato (il primer F, a cavallo dei due esoni, è specifico per la forma spliced)	RT-PCR con cDNA sintetizzato con oligo(dT) RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzato con ZCN8-rev	F GGGAGTACTTGCCTGGATGG R TTGACAGTTGAAATATGTAGCGG
ZCN8 (100127519) Trascritti senso non-processato e antisenso (I primer F e R, localizzati negli introni, sono specifici per la forma non- processata)	RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzati con ZCN8-for e ZCN8-rev	F TGGTTGGTAACCTTGAGGTGTC R CAAGGAGCACTGAAGTATGTGG
ZCN8 (100127519) Trascritti processati e non-processati (ZCN8-1 e ZCN8-2 nella Figura 8 della sezione risultati)	RT-PCR con cDNA sintetizzato con oligo(dT)	F AAGAGCAACGGCCAATACCATTAGCGA R CAGTGGCCTATGGTTTCTACTCTTCCT

<p>ZCN8 (100127519)/ZCN7 (100127518) Trascritti processati e non-processati (ZCN7/8-1 and ZCN7/8-2 nella Figura 9 della sezione risultati)</p>	<p>RT-PCR strand-specific con cDNA sintetizzati con ZCN8for/ ZCN7for e ZCN8rev/ ZCN7rev</p>	<p>F TCATTTGGTTATGGCTCGTGT R AGTGATGGATGGCTTGGACTT</p>
<p>ZCN7 (100127518) Trascritto non-processato (ZCN7-1 and ZCN7-2 nella Figura 9 della sezione risultati)</p>	<p>RT-PCR con cDNA sintetizzato con oligo(dT)</p>	<p>F CTATCTGGGTGACGTATGACATCAC R CGTTAAGAGAATAAGCTCTCAATCCTCA</p>
<p>ZCN7 (100127518) Trascritto processato (ZCN7/8-s and ZCN7-3 nella Figura 9 della sezione risultati)</p>	<p>RT-PCR con cDNA sintetizzato con oligo(dT)</p>	<p>F GGGAGTACTTGCACTGGATGG R TTGACAGTTGAAATGTGTAGCAC</p>
<p>Mu (Accession: M76978) TIRA</p>	<p>RT-PCR con cDNA sintetizzato con primer random hexamer e con primer oligo(dT) RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzati con MuTIRrev e con MuTIRfor</p>	<p>F GGGATTCGACGAAATGGAGGC R GCGCAGGCGAACGGTAAACG</p>
<p>CRM2 (Accession: AY129008) LTR</p>	<p>RT-PCR con cDNA sintetizzato con primer random hexamer e con primer oligo(dT) RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzati con CRM2LTRrev e con CRM2LTRfor</p>	<p>F TCGTCAACTCAACCATCAGGTGAT R GCAAGTAGCGAGAGCTAAACTTGA</p>

Cinful/Zeon (Accession: <i>AF049110</i>) LTR	RT-PCR con cDNA sintetizzato con primer random hexamer e con primer oligo(dT)	F CGCCGAAGGTCTTCTAGGAA R GGAGACTCGTTCTCAAGTGCTA
	RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzati con Cinful/ZeonLT Rev e con Cinful/ ZeonLT Rfor	
Prem2/ji (Accession: <i>U4100</i>) LTR	RT-PCR con cDNA sintetizzato con primer random hexamer e con primer oligo(dT)	F CGCCGAAGGTCTTCTAGGAA R GGAGACTCGTTCTCAAGTGCTA
	RT-PCR strand specific con cDNA sintetizzati con Prem2/JiLTRr ev e con Prem2/ JiLTRfor	
gapc2 (542718) Trascritto	RT-PCR	F CACTGCTACCCAGAAGACTGTTG R GTATCCCCACTCGTTGTCGTAC
EF1-α (542581) Trascritto	RT-PCR	F TGATGAGATTGTGAAGGAAGTC R CAGAGATTGGAACGAAGTGG
aat (100280822) Trascritto	RT-PCR	F ATGGGGTATGGCGAGGAT R TTGCACGACGAGCTAAAGACT

Le condizioni di PCR utilizzate per l'amplificazione della regione di *ZCN8* con i primer *ZCN8-1* e *ZCN8-2*, localizzati rispettivamente nel primo e nell'ultimo esone, sono le stesse descritte da Danilevskaya *et al.* (2008a) (vedere Figura 3 in Informazioni suppl). Condizioni di

PCR simili sono state utilizzate per tutte le altre *primer combination*, con l'eccezione della temperatura di *annealing* dei *primer*.

Per le RT-PCR *strand specific* (*ZCN8*, *TE* e geni di controllo), le condizioni utilizzate sono le seguenti: 95°C per 5 minuti, seguito da un ciclo di amplificazione di 30 secondi a 94°C, 15 secondi a 60°C e 45 secondi a 72°C. Questo ciclo è stato ripetuto per un numero variabile di volte, a seconda della *primer combination* e del template utilizzati, al fine di ottenere condizioni di amplificazione non saturanti.

La specificità di ciascun *primer* è stata verificata clonando e sequenziando il frammento amplificato utilizzando come template cDNA e/o DNA genomico. Per le *primer combination* specifiche per un particolare *locus* genico (ad esempio quelle utilizzate per distinguere *nfc101* da *nfc102* o *ZCN8* da *ZCN7*, etc.) sono stati sequenziati otto cloni e la specificità dei *primer* è stata verificata valutando la presenza in tutti e otto i cloni del polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) o della piccola inserzione/delezione (INDEL) specifica per il *locus* genico in esame.

3.6. Reazioni di real-time qRT-PCR

Le reazioni di real-time qRT-PCR sono state condotte utilizzando SYBER Green I (Sigma) e il real-time iCyclerIQ (Biorad). L'amplificazione del frammento in esame è stata monitorata valutando l'incorporazione del SYBER Green I, in accordo con le raccomandazioni del produttore di real-time iCyclerIQ.

Le analisi dei dati ottenuti mediante real-time qRT-PCR sono state condotte come descritto di seguito. La proporzione relativa dei templati in ciascun campione è stata determinata in base al valore numerico del ciclo soglia (CT: threshold cycle) ottenuto per ciascuna reazione di PCR. Il valore del CT corrisponde al numero del ciclo nel quale la fluorescenza supera di 10 volte la deviazione standard media determinata dal valore di fondo di ciascun pozzetto nel quale è condotta la reazione di PCR. Per ciascun tipo di tessuto/genotipo sono state eseguite due preparazioni indipendenti di cDNA derivanti da due repliche biologiche. Per ciascuna preparazione di cDNA sono state fatte tre repliche di Real-Time qRT-PCR, per un totale di sei repliche. Per ciascuna delle tre repliche, è stato calcolato, oltre al valore medio del CT, anche l'errore standard. Il valore Δ CT è stato calcolato sottraendo i valori medi dei rispettivi CT dei campioni che si vuole paragonare. I dati sono espressi come fold difference (FD) nella linea mutante rispetto alla linea selvatica. Nello specifico, il valore di FD per una determinata *primer* combination è stato calcolato esponendo a 2 il valore di Δ CT (FD della linea mutante verso la linea selvatica = $2^{[CT_{selvatico} - CT_{mutante}]}$). Per minimizzare le differenze dovute alla sintesi del cDNA e all'efficienza della reazione di amplificazione, i dati sono stati normalizzati sulla quantità del trascritto del gene *gapc2*.

Risultati simili sono stati ottenuti normalizzando i dati sulla quantità del trascritto del gene *EF-1 α* . L'equazione per il calcolo del valore FD è stata applicata al gene *gapc2* per ottenere il valore $FD(gapc2)_{mutante}$. Il valore standardizzato di FD è stato quindi calcolato come

$FD(\text{geneX})_{\text{mutante}}/FD(\text{gapc2})_{\text{mutante}}$. La significatività statistica ($P \leq 0.05$) dei dati ottenuti dagli esperimenti di real-time qRT-PCR è stata calcolata utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA), considerando le repliche biologiche di ciascun campione come effetti casuali e gli effetti dovuti al "background" genetico come effetti fissi.

3.7. Saggi di estrazione e fissazione della cromatina da materiale fresco

I materiali MA e LB, proveniente da piante mutanti *nfc101/nfc102* e da piante B73, è stato subito immerso in MC buffer (NaPi 10 mM, pH 7, NaCl 50 mM e saccarosio 0.1 M) a 4°C per non più di 5 ore dall'inizio della reazione di cross-linking. Solitamente, 1.5 g di tessuto sono stati immersi in un tubo falcon da 50 ml contenente 35 ml di MC buffer. Per favorire la fissazione al DNA delle proteine leganti il DNA (come NFC101/NFC102 e Rpd3, che non legano direttamente il DNA) sono state adottate due procedure di fissazione (Nowak *et al.*, 2005). La procedura di fissazione consiste in un primo passaggio di cross-link della proteina di interesse al complesso multi-proteico e di un secondo passaggio, che prevede il trattamento con la formaldeide, per legare il complesso multi-proteico al DNA. Il disuccinimidil glutarato (DSG; Sigma-Aldrich), preparato in DMSO 0.5 M immediatamente prima dell'utilizzo, è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 2 mM a ciascun tubo falcon contenente il campione in buffer MC. La reazione di fissazione è stata eseguita mediante infiltrazione in pompa a vuoto per 30 minuti a temperatura ambiente, seguita da tre lavaggi consecutivi con 30 ml di MC buffer a

temperatura ambiente e da una agitazione delicata di 5 minuti al termine di ciascun lavaggio. Al termine dell'ultimo lavaggio, al tubo falcon è stata aggiunta formaldeide alla concentrazione finale dell'1%, seguito da un'infiltrazione di 10 minuti in pompa a vuoto a temperatura ambiente. La reazione di fissazione è stata bloccata aggiungendo glicina alla concentrazione finale di 0.17 M, seguita da un'infiltrazione di 5 minuti in pompa a vuoto a temperatura ambiente. I campioni fissati sono stati lavati tre volte con acqua a 4°C, asciugati accuratamente con fazzoletti di carta e quindi congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

3.8. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) da materiale fresco

La cromatina è stata estratta dai tessuti fissati e congelati ridotti in fine polvere mediante l'utilizzo di azoto liquido, seguito da un'omogeneizzazione in lysis buffer (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, TritonX-100 1%, deoxycolato 0.1%, SDS 0.1%, PMSF 1 mM, Sodio butirrato 10 mM, aprotinina 1 mg/ml, pepstatina A 1 mg/ml e leupeptina 1 mg/ml). L'omogenato è stato scaldato 5 minuti a 60°C, centrifugato 2 minuti a 500g, filtrato attraverso due strati di miracloth e lavato quattro volte con lysis buffer senza inibitori (ogni lavaggio è costituito da una centrifugata a 4°C di 20 minuti a 5000g), per rimuovere le contaminazioni citoplasmatiche. Il pellet ottenuto è stato risospeso in lysis buffer. Il DNA estratto è stato ridotto in frammenti di 350-800 bp mediante 5 cicli di sonicazione ciascuno di 15 secondi a potenza 0.5, seguiti ognuno da

un incubazione di 5 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato attentamente prelevato e quantificato mediante spettrofotometro. L'efficienza della procedura di fissazione è stata valutata mediante un'estrazione con fenolo:cloroformio di tessuti fissati e non fissati, come descritto da Haring *et al.*, (2007). Solitamente da 1 g di MA e da 1 g di LB si ottengono rispettivamente 12 µg e 5.5 µg di cromatina. Il metodo di cross-linking a due fasi è stato utilizzato anche per l'analisi delle modifiche istoniche. Tuttavia, in questo caso, la fissazione è stata eseguita omettendo il primo step di fissazione con il DSG e cominciando direttamente con lo step di fissazione con formaldeide (Locatelli *et al.*, 2009). L'omissione dello step di fissazione con DSG ha consentito di ottenere migliori efficienze di estrazione della cromatina (da 1 g di MA e da 1 g di LB si ottengono, rispettivamente, 23 µg e 10 µg). Utilizzando la stessa quantità di cromatina nei saggi di ChIP, le due tipologie di fissazioni hanno, tuttavia, prodotto gli stessi risultati nell'analisi delle modifiche istoniche. Una frazione di cromatina sonicata è stata messa da parte e, dopo la reazione di ripristino del cross-linking (vedere in seguito), è stata utilizzata come Input per la normalizzazione delle reazioni di real-time qRT-PCR. Per ciascun saggio di ChIP, sono stati utilizzati 10 µg di cromatina incubata con 60 µl di DNA di sperma di salmone/proteina agarosio A (Upstate) per 4 ore a 10°C. Dopo centrifugazione, i complessi proteina-DNA sono stati immunoprecipitati tutta notte a 10°C con l'anticorpo specifico. Solitamente, sono state utilizzate le seguenti quantità per i differenti anticorpi: 10 µl di affinity-purified anti-MSI4 (Kenzior e Folk, 1998;

Rossi *et al.*, 2001); 18 µl di anti-ZmRpd3I (questo anticorpo dovrebbe riconoscere i membri di classe I delle HDAC di tipo Rpd3 di mais, specificamente le proteine hda101, hda102 e hda108 (Rossi *et al.*, 2003; Varotto *et al.*, 2003); 5 µg di a-H3ac (Millipore; 06-599); 8 µg di a-H3K4me2 (Millipore; 07-030); 10 µg di a-H3K27me3 (Millipore; 07-449); 10 µg di a-H3K9me2 (Millipore; 07-441). Il controllo negativo della reazione è stato eseguito omettendo l'anticorpo alla reazione di incubazione. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 60 µl di DNA di sperma di salmone/proteina agarosio A (Upstate), seguito da un incubazione di 4 ore a 10°C. La proteina agarosio A legante il complesso proteina-anticorpo è stata in seguito lavata con i seguenti buffer: low salt buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM e SDS 0.1%), high salt buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM e SDS 0.1%), LNDET buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, LiCl 250 mM, Nonidet P-40 1% e Na deoxicolato 1%), e due lavaggi consecutivi con TE buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8 e EDTA 1 mM). Al termine dei lavaggi, la cromatina è stata eluita mediante due incubazioni consecutive di 30 minuti a 65°C con una soluzione di NaHCO₃ 0.1 M e SDS 1% in un volume finale di 500 µl. il distacco della cromatina immunoprecipitata dall'anticorpo è stato eseguito mediante un incubazione di 15 ore a 65°C in presenza di NaCl alla concentrazione finale di 0.2 M. I campioni sono stati trattati per un'ora con 2 µg di proteinasi K, seguito da due estrazioni con fenolo:cloroformio. Il DNA è stato precipitato e risospeso in 75 µl di acqua sterile deionizzata. Per ciascuna reazione di real-time qRT-PCR

è stato utilizzato 1 μ l di DNA immunoprecipitato e 1 μ l della diluizione 1:50 di DNA Input. Per ciascun tipo di anticorpo e per ciascuna tipologia di materiale campionata sono stati eseguiti due esperimenti indipendenti di ChIP. Per ciascuna ChIP e per ciascuna regione genomica analizzata sono state eseguite tre repliche di real-time qRT-PCR, per un totale di sei repliche. Le reazioni di real-time qRT-PCR sono state condotte come descritto nel paragrafo 6. Per le sei repliche di real-time qPCR sono stati calcolati il valore medio di CT e l'errore standard. I dati sono stati espressi come percentuale di immunoprecipitato rispetto all'Input (FD), ottenuto calcolando il valore di Δ CT tra il valore medio di CT rispettivamente dell'immunoprecipitato e dell'Input corrispondente, ed elevando a 2 tale valore di Δ CT. I dati ottenuti dagli esperimenti di ChIP sono stati analizzati per valutare le differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$). Nello specifico, i valori di CT derivanti dalle tre repliche biologiche, eseguite per ciascun dei due saggi indipendenti di ChIP, sono stati utilizzati per calcolare il test F nell'analisi della varianza, che è stata eseguita assumendo le repliche biologiche come effetti casuali e i differenti genotipi come effetti fissi. Le sequenze dei primer utilizzati nei saggi di ChIP sono riportati nella tabella 3.

Tabella 3 – Lista dei *primer* utilizzati per la quantificazione degli immunoprecipitati in real-time qRT-PCR.

a: tra parantesi è riportato il numero identificativo del gene, preso da GeneBank. Fanno eccezione le sequenze dei TE, per i quali è riportato il Accession number.

b: sequenza del primer indicata in orientamento 5'-3'. F: primer forward; R: primer reverse.

Nome del primer ^a	Sequenza del primer ^b
FLCP128/ZMM4 (542041) Regione genomica 5'- terminale	F GTCCCCTCACCTCCCTCC R CCCTCTCCTGATCTCAACCTAAA
FLCP128/ZMM4 (542041) Regione genomica 3'- terminale	F ATAGCCCAAAATCCAGCAAGT R GGCACATGCTATGGTAGTGAAA
FLCP109/ZMM15 (542032) Regione genomica 5'- terminale	F TCACCTCACCTTCTCCTTTGA R TTGTTCCCTTACGAGAGGCTTG
FLCP109/ZMM15 (542032) Regione genomica 3'- terminale	F AGCAACTCTTCCCGTTTATCC R AGTGGGTTTGCCGTATCTTTT
id1 (541693) Regione genomica 5'- terminale	F ATAATCACGCTTGGACAGCAC R CTGCGCTTGTCTCTCTCTGTT
id1 (541693) Regione genomica 3'- terminale	F TCTTCTCAACGCCAGCAATAATA R CGTGCATATGGAGGTCAAGATAG
ZCN8 (100127519) Regione genomica 5'- terminale	F GCAACGGCCAATACCATTAG R TAGCTCAGCACTTGGCAGAA
ZCN8 (100127519) Regione genomica interna (quarto esone)	F TGGTTGGTAACCTTGAGGTGTC R CAAGGAGCACTGAAGTATGTGG
ZCN8 (100127519) Regione genomica 3'- terminale	F CATAGGCCACTGCATGGTC R TTGAAACAAGCAGGTACTCTAGTAAGAT
Mu (Accession: M76978) TIRA	F GGGATTTCGACGAAATGGAGGC R GCGCAGGCGAACGGTAAACG
CRM2 (Accession: AY129008) LTR	F TCGTCAACTCAACCATCAGGTGAT R GCAAGTAGCGAGAGCTAAACTTGA

Cinful/Zeon (<i>Accession:</i> <i>AF049110</i>)	F CGCCGAAGGTCTTCTAGGAA R GGAGACTCGTTCTCAAGTGCTA
LTR	
<hr/>	
Prem2/Ji (<i>Accession:</i> <i>U4100</i>)	F ACATTTGGTGGTTGGGGCTA R GGGTGAATAGGGCGAACTGA
LTR	

3.9. Saggi di estrazione e fissazione della cromatina da materiale congelato

I tessuti corrispondenti alla foglia immatura e alla foglia matura dei mutanti *idl* e delle piante selvatiche sono stati ottenuti nel laboratorio del prof. Joseph Colasanti. Il materiale è stato raccolto e subito congelato in azoto liquido. Il materiale è stato quindi spedito al nostro laboratorio dove si è proceduto con la fissazione e l'estrazione della cromatina e con gli esperimenti di ChIP. Tale protocollo è stato, quindi, usato perché consente la fissazione della cromatina partendo da materiale congelato. Esso è stato adattato partendo da un protocollo simile messo a punto su tessuti congelati di *Arabidopsis* (prof. Liam, sito web non più disponibile). La verifica che questo protocollo permette di ottenere risultati paragonabili a quello in cui la fissazione viene fatta su materiale fresco è stata effettuata eseguendo esperimenti di ChIP e valutando il livello di modifiche istoniche per sequenze di cui conosciamo il livello di tali modifiche: la sequenza che codifica per il gene *actina 1* (analizzata mediante i primer MAc1-3: 5' – AGGTGCTGTTCCAACCATCC – 3' e MAc1-4: 5' – AGATCCCCACTGAGGACAA – 3') per valutare le modifiche istoniche correlate a cromatina trascrizionalmente attiva e la sequenza che codifica per 935 (analizzata mediante i primer AC177935-1: 5' –

GGCTCGTCAAGGTAGCTGTC – 3' e AC177935-2: 5' – CACCAGGGAAGTCATCTCGT – 3') per valutare il livello di H3K27me3 correlata a cromatina trascrizionalmente inattiva.

Il materiale congelato è stato finemente macinato in azoto liquido ed è stato trasferito in un tubo falcon al quale è stato aggiunto nuclear isolation buffer (NIB) (KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, Hepes 10 mM, pH 7.6, saccarosio 1 M, Triton X-100 0.6%, PMSF 1 mM e 2 β mercapto-etanolo 14 mM). Solitamente, vengono aggiunti 25 ml di NIB buffer ogni 1.2 g di tessuto. La reazione di fissazione con la formaldeide, eseguita per 15 minuti a temperatura ambiente, è stata bloccata aggiungendo glicina alla concentrazione finale di 0.14 M, seguita da una filtrazione mediante doppio strato di miracloth. Il pellet, ottenuto dopo centrifugazione, è stato lavato 2 volte con NIB buffer (senza Triton X-100, PMSF e 2 β mercapto-etanolo) e risospeso in lysis buffer con SDS 1% (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, EDTA 10 mM, 1 mM PMSF, 1 mg/μl aprotinina, 1 mg/μl pepstatina A, 1 mg/μl leupeptina, 10 mM Na-butirrato). Il DNA estratto è stato ridotto in frammenti di 350-800 bp mediante 5 cicli di sonicazione ciascuno di 15 secondi a potenza 0.75, seguiti ognuno da un incubazione di 5 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato attentamente prelevato e quantificato mediante spettrofotometro. L'efficienza della procedura di fissazione è stata valutata mediante un'estrazione con fenolo:cloroformio di tessuti fissati e non fissati, come descritto da Haring *et al.*, (2007). Per ogni campione sono state preparate aliquote di 10 μg di cromatina congelate a -80°C. Solitamente da 1 g di foglia matura e da 1 g di foglia immatura si

ottengono rispettivamente 5 µg e 25 µg di cromatina. Una frazione di cromatina sonicata è stata messa da parte e, dopo la reazione di ripristino del cross-linking (si veda in seguito), è stata utilizzata come Input per la normalizzazione delle reazioni di real-time qRT-PCR.

3.10. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) da materiale congelato

Prima di utilizzare questo metodo per l'analisi delle modifiche istoniche dei geni in esame, abbiamo testato la sua efficacia e la sua affidabilità rispetto al protocollo classico (paragrafi 3.7 e 3.8), utilizzandoli entrambi per analizzare modifiche istoniche note su geni di riferimento (come il gene dell'actina). Per ciascun saggio di ChIP, sono stati utilizzati 10 µg di cromatina diluiti in lysis buffer con SDS 1% (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 mg/µl, pepstatina A 1 mg/µl, leupeptina 1 mg/µl, sodio butirato 10 mM) e in ChIP dilution buffer (EDTA 1 mM, Tris-HCl 15 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, aprotinina 1 mg/µl, pepstatina A 1 mg/µl, leupeptina 1 mg/µl, sodio butirato 10 mM). Ogni aliquota è stata incubata con 60 µl di DNA di sperma di salmone/proteina agarosio A (Upstate) per 4 ore a 10°C. Dopo centrifugazione, i complessi proteina-DNA sono stati immunoprecipitati tutta notte a 10°C con l'anticorpo specifico. Solitamente, sono state utilizzate le seguenti quantità per i differenti anticorpi: 10 µl di affinity-purified anti-MSI4 (Kenzior e Folk, 1998; Rossi *et al.*, 2001); 18 µl di anti-ZmRpd3I (questo anticorpo dovrebbe riconoscere i membri di classe I delle HDAC di tipo Rpd3 di mais,

specificamente le proteine hda101, hda102 e hda108 (Rossi *et al.*, 2003; Varotto *et al.*, 2003); 5 µg di a-H3ac (Millipore; 06-599); 8 µg di a-H3K4me2 (Millipore; 07-030); 10 µg di a-H3K27me3 (Millipore; 07-449); 10 µg di a-H3K9me2 (Millipore; 07-441). Manca H3K36me2, H3K4me3 e H3ac. Il controllo negativo della reazione è stato eseguito omettendo l'anticorpo alla reazione di incubazione. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 60 µl di DNA di sperma di salmone/proteina agarosio A (Upstate), seguito da un incubazione di 4 ore a 10°C. La proteina agarosio A legante il complesso proteina-anticorpo è stata in seguito lavata con i seguenti buffer: low salt buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM e SDS 0.1%), high salt buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM e SDS 0.1%), LNDET buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, LiCl 250 mM, Nonidet P-40 1% e Na deoxicolato 1%), e due lavaggi consecutivi con TE buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8 e EDTA 1 mM).

Al termine dei lavaggi, la cromatina è stata eluita mediante due incubazioni consecutive di 30 minuti a 65°C con una soluzione di NaHCO₃ 0.1 M e SDS 1% in un volume finale di 500 µl. Il distacco della cromatina immunoprecipitata dall'anticorpo è stato eseguito mediante un incubazione di 15 ore a 65°C in presenza di NaCl alla concentrazione finale di 0.2 M. I campioni sono stati trattati per un'ora con 2 µg di proteinasi K, seguito da due estrazioni con fenolo:cloroformio. Il DNA è stato precipitato e risospeso in 75 µl di acqua sterile deionizzata. Per ciascuna reazione di real-time qRT-PCR è stato utilizzato 1 µl di DNA immunoprecipitato e 1 µl della

diluizione 1:50 di DNA Input. Per ciascun tipo di anticorpo e per ciascuna tipologia di materiale campionato sono stati eseguiti due esperimenti indipendenti di ChIP. Per ciascuna ChIP e per ciascuna regione genomica analizzata sono state eseguite tre repliche di real-time qRT-PCR, per un totale di sei repliche. Le reazioni di real-time qRT-PCR sono state condotte come descritto nel paragrafo 3.6. Per le sei repliche di real-time qRT-PCR sono stati calcolati il valore medio di CT e l'errore standard. I dati sono stati espressi come percentuale di immunoprecipitato rispetto all'Input (FD), ottenuto calcolando il valore di ΔCT tra il valore medio di CT rispettivamente dell'immunoprecipitato e dell'Input corrispondente, ed elevando a 2 tale valore di ΔCT . I dati ottenuti dagli esperimenti di ChIP sono stati analizzati per valutare le differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$). Nello specifico, i valori di CT derivanti dalle tre repliche biologiche, eseguite per ciascun dei due saggi indipendenti di ChIP, sono stati utilizzati per calcolare il test F nell'analisi della varianza, che è stata eseguita assumendo le repliche biologiche come effetti casuali e i differenti genotipi come effetti fissi. Le sequenze dei *primer* utilizzati nei saggi di ChIP sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4 – Lista dei *primer* utilizzati per la quantificazione degli immunoprecipitati in real-time qRT-PCR.

a: accanto al nome del gene, tra parentesi, è riportato il numero identificativo del gene, preso da GeneBank. La lettera dell'alfabeto riportata tra parentesi si riferisce alla regione in cui sono situati i rispettivi *primer* in riferimento alla figura 19 nella sezione Risultati.

b: sequenza del primer indicata in orientamento 5'-3'. F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

Nome del primer ^a	Sequenza del primer ^b
ZCN8 (100127519) Regione genomica 5' promotore (A)	F CTCCAGCCATTCCTTCGGT R CATACTCAGTGCATGTTCTTCCAA
ZCN8 (100127519) Regione genomica 5' terminale (B)	F GCAACGGCCAATACCATTAG R TAGCTCAGCACTTGGCAGA
ZCN8 (100127519) Regione splicing interno (C)	F TGACATGAGGGCTTTCTACACC R CTACAACCTAAGCTCCACAGATAC
ZCN8 (100127519) Regione genomica interna (terzo introne) (D)	F TGGTTGGTAACCTTGAGGTGTC R CAAGGAGCACTGAAGTATGTGG
ZCN8 (100127519) Regione genomica 3' terminale (E)	F CATAGGCCACTGCATGGTC R TTGAAACAAGCAGGTACTCTAGTAAGAT
ZCN7 (100127518) Regione genomica 5' promotore (A)	F ATGCAACAAAGAGAGCACAAAA R TACCTTAGTGTTTGTCTTCCGC
ZCN7 (100127518) Regione genomica 5' terminale (B)	F GTTAAAAAATCATGCTTTGACAAAG R TGTAGGACACGAGCCATAACC
ZCN7 (100127518) Regione splicing interno (C)	F GCAATTTACAGATAATGCTACCCGA R CTGCACCAATTCAGTGGTCAAC
ZCN7 (100127518) Regione genomica interna (terzo introne) (D)	F TTTAATTGGTTGGCAACATCAG R TGTGGGGACATCGACATTTATT
ZCN7 (100127518) Regione genomica 3' terminale (E)	F TTTGTAATGACTTGAAGGATTGAGAG R TGGGAATAAGGAATGATGTGTTG

3.11. Saggi di northern blotting per l'analisi dei trascritti *strand specific* di *ZCN8*

I saggi di Northern blotting sono stati condotti utilizzando 20 µg di RNA totale e il NorthernMax kit (Ambion), seguendo le istruzioni del produttore. Il marker RNA Millenium (Ambion) è stato utilizzato per stimare la lunghezza delle molecole di RNA ibridate. I blot sono stati ibridati con sonde a RNA specifiche per il filamento senso e il filamento antisenso di *ZCN8*. Specificamente, il cDNA, sintetizzato con primer di oligo(dT) a partire da RNA estratto dai tessuti LB di piante selvatiche, è stato utilizzato come template nelle reazioni di PCR con i primer *ZCN8*-6 (5'-AAGTCCAAGCCATCCATCAC-3') e *ZCN8*-7 (5'-GCATATAGAGGTGGTGCATTGA-3'). L'amplicone ottenuto corrisponde al cDNA di *ZCN8*, che deriva dal trascritto senso processato di *ZCN8*. Esso è costituito da 95 nucleotidi della regione 3'-terminale del terzo esone e da 300 nucleotidi dell'estremità 5'-terminale del quarto esone. L'amplicone è stato clonato nel vettore pGEM-T-easy (Promega), sequenziato ed utilizzato per la trascrizione *in vitro* con il kit MAXIscript T6/SP6 della Promega, seguendo il protocollo fornito dal produttore. La trascrizione è stata eseguita utilizzando gli enzimi T7 o SP6 per produrre rispettivamente la sonda a RNA antisenso e senso. Poiché la sonda è rappresentata quasi interamente dalla sequenza corrispondente al quarto esone di *ZCN8*, essa può simultaneamente ibridare sia con il trascritto processato sia con il trascritto non-processato di *ZCN8*.

Inoltre, *ZCN8* presenta un'elevata similarità di sequenza con altri membri della famiglia genica *ZCN* (Danilevskaya *et al.*, 2008a). Nello

specifico, esso mostra il 95% e il 87% di identità rispettivamente con la regione codificante e la regione genomica di *ZCN7*, per il quale è stata rilevata solo la forma non-processata del trascritto mediante saggi di RT-PCR (Danilevskaya *et al.*, 2008a). Non è, pertanto, possibile disegnare delle sonde a RNA specifiche per il gene *ZCN8*. Non è quindi da escludere che nei saggi di northern blotting siano stati rilevati anche altri trascritti oltre a quelli di *ZCN8*.

3.12. Clonaggio del cDNA di *ZCN8* e di *ZCN7* prodotti dai rispettivi trascritti antisenso

Per il clonaggio dei cDNA di *ZCN8* e di *ZCN7* prodotti dai rispettivi filamenti antisenso di RNA, i cDNA sintetizzati con i primer *ZCN8for* e *ZCN7for* son stati utilizzati come templatò nelle rispettive reazioni di PCR. I *primer* utilizzati nella PCR sono *ZCN8for* e *ZCN7/8-3* (5'-GCATATAGAGGTGGTGCATTGA-3') per *ZCN8* e *ZCN7for* e *ZCN7/8-3* per *ZCN7*. I *primer forward* sono localizzati a monte del codone di inizio della trascrizione ATG rispettivamente di *ZCN8* e di *ZCN7*. Il *primer ZCN7/8-3* è localizzato a valle del codone di stop. Essi permettono l'amplificazione del cDNA che copre l'intera regione codificante il filamento senso dell'RNA. Gli ampliconi sono stati, in seguito, clonati utilizzando il pGEM-T-easy cloning kit (Promega) e 10 cloni per ciascun tipo di clonaggio sono stati sequenziati su entrambi i filamenti. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono riportate nella Figura suppl. 5.

Risultati

4.1. Strategia impiegata per analizzare i possibili target di NFC101/NFC102

Informazioni derivanti dagli studi condotti sul gene *FVE/MSI5* di *Arabidopsis*, hanno consentito di scegliere quali geni analizzare come putativi target di NFC101/NFC102. La strategia impiegata è stata, infatti, quella di analizzare i geni di mais omologhi ai geni target di *FVE/MSI5* e stabilire se questi geni costituiscono un bersaglio di NFC101/NFC102. Per fare ciò, come prima cosa è stato verificato se, nelle linee mutanti *nfc101/nfc102*, si assiste ad una variazione dei trascritti prodotti da questi geni. In particolare, è stata analizzata la variazione di tali trascritti in tutte e quattro le linee mutanti *nfc101/nfc102*, poiché esse rappresentano ciascuna un'inserzione unica del transgene in distinte regioni del genoma. Questo consente di minimizzare gli effetti dovuti all'inserzione del transgene nel genoma, che possono generare alterazioni fenotipiche e molecolari non specificamente correlate alla sotto-espressione di *nfc101/nfc102*. Poiché le linee con sotto-espressione di *nfc101/nfc102* sono state introgredite nel "background" genetico di B73, la linea *inbred* di mais B73 è stata utilizzata come pianta selvatica di controllo. Quando necessario, anche piante selvatiche derivanti dal processo di introgressione dei transgeni *nfc101/nfc102* in B73 (Figura 1 in Materiali e metodi) sono state usate come controllo per le analisi molecolari.

I geni che hanno mostrato una variazione del trascritto statisticamente significativa in tutte e quattro le linee mutanti rispetto al controllo, sono state quindi analizzati per verificare, mediante saggi di ChIP, se le proteine NFC101/NFC102 legano direttamente il gene in esame. Per questa indagine, così come per quelle descritte di seguito, considerandone la laboriosità, è stata selezionata una sola linea con sotto-espressione di *nfc101/nfc102*. Questa linea è denominata R102, poiché essa mostra la maggiore sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* (Figura 2 in Materiali e metodi) e la presenza di tutte le variazioni fenotipiche osservate nei mutanti.

Infine, per i geni per i quali è stato verificato un legame diretto con le proteine NFC101/NFC102, è stata investigata l'eventuale variazione di modifiche istoniche e il legame, a livello della sequenza genica in esame, della istone deacetilasi di tipo Rpd3, per il quale disponevamo di un anticorpo funzionale in esperimenti di ChIP.

4.2. Gli effetti della sotto-espressione di *nfc101/nfc102* sui geni coinvolti nella transizione fiorale di mais

4.2.1. In mais sembra non esistere un gene omologo a *AtFLC*

In *Arabidopsis*, il gene target di FVE meglio caratterizzato è il gene MADS-box *FLC* (He *et al.*, 2009). Sebbene in mais non si è ancora identificato un gene funzionalmente omologo a *FLC*, nel marzo 2010, è stata resa disponibile una lista di 25 geni di mais che codificano per fattori di trascrizione di tipo MADS-box

(<http://www.chromdb.org>), coinvolti nel processo di fioritura e che mostrano una certa omologia di sequenza con *FLC*. Le proteine codificate da tali geni sono state denominate FLCP (FLOWERING CONTROL ASSOCIATED PROTEINS).

Partendo da queste informazioni, è stato analizzato il livello dei trascritti dei 25 geni *FLCP* nel tessuto arricchito in area meristemica (MA), campionato da piante cresciute fino allo stadio V3/V4. Tale tessuto contiene il SAM e le foglie primordiali ed è stato campionato allo stadio che precede la transizione fiorale (Meng *et al.*, 2011). Il tessuto MA è stato scelto per l'analisi dei trascritti dei geni *FLCP* poiché si presume che i geni coinvolti nella transizione tra fase vegetativa e fase di fioritura siano espressi in questo tessuto e durante questo stadio di sviluppo.

Per prima cosa, è stato estratto l'RNA totale dal tessuto MA sia da piante mutanti *nfc101/nfc102* sia da piante selvatiche. Grazie alla pubblicazione *on line* delle sequenze dei geni *FLCP* di mais (<http://www.chromdb.org>), sono stati disegnati dei *primer* che consentissero di verificare, mediante RT-PCR, la presenza o meno del trascritto dei 25 geni *FLCP* a livello del tessuto MA. Le RT-PCR, in particolare, sono state condotte con un elevato numero di cicli per favorire anche i geni poco espressi.

Innanzitutto, è stato osservato che sei geni *FLCP* non sono trascritti a livello del tessuto MA. Questi 6 geni, infatti, non sono coinvolti nella regolazione della transizione fiorale. Essi sono trascritti specificamente nelle infiorescenze, dopo che esse si sono già differenziate (Becker e Theissen, 2003).

In seguito, è stato quantificato il trascritto dei restanti 19 geni mediante real-time qRT-PCR. I dati sono stati normalizzati sulla base dei trascritti dei geni di controllo *gapc2* o *EF-1 α* .

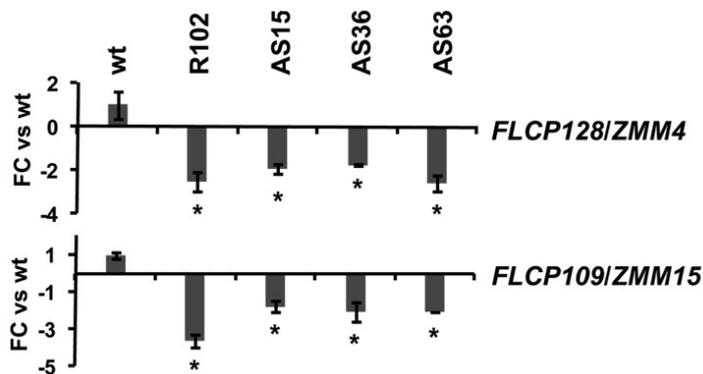


Figura 1 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti dei gene *ZMM4/FLCP128* e *ZMM15/FLCP109* nel tessuto MA, di piante mutanti *nfc101/nfc102* e di piante selvatiche, cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA dei rispettivi geni normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano variazioni statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

I risultati indicano che nessuno di questi 19 geni mostra una variazione statisticamente significativa del livello di espressione nei mutanti *nfc101/nfc102* rispetto al controllo (vedere Figura XXX in Informazioni supplementari), tranne i geni *FLCP128/ZMM4* e

FLCP109/ZMM15, il cui livello di espressione si riduce in tutte le linee transgeniche rispetto alla linea selvatica (Figura 1).

I geni *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* appartengono alla famiglia dei fattori trascrizionali di tipo MADS-box *APETALA1/FRUITFUL* di *Arabidopsis*, che sono tra i *target* che agiscono a valle di FLC. Pertanto, *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* non sono presumibilmente coinvolti nella transizione fiorale ma sono geni che determinano l'“identità” delle infiorescenze e il loro sviluppo (Danilevskaya *et al.*, 2008b).

Per verificare se la variazione dei trascritti di *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* fosse dovuta ad un'azione diretta di NFC101/NFC102, è stata impiegata la tecnica ChIP per analizzare il legame delle proteine NFC101/NFC102 a questi geni. A questo scopo, è stato utilizzato l'anticorpo anti-AtFVE, precedentemente testato per la sua capacità di legare specificatamente anche le proteine di mais NFC101/NFC102 (vedere Figura X in Informazioni supplementari). Gli immunoprecipitati sono stati, quindi, quantificati mediante real-time qRT-PCR, utilizzando combinazioni di *primer* specifiche per le sequenze geniche *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*.

I risultati indicano che i geni *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* costituiscono un bersaglio indiretto delle proteine NFC101/NFC102 poiché, nelle piante selvatiche, esse non legano questi geni (Figura 2).

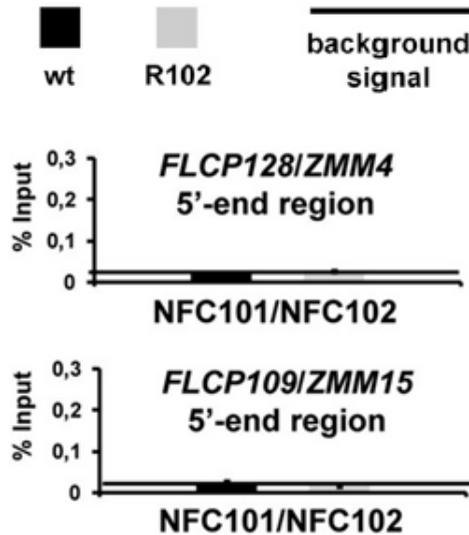


Figura 2 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato a livello della regione 5'-terminale rispettivamente dei geni *ZMM4/FLCP128* e *ZMM15/FLCP109*. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato con anticorpi anti-AtFVE rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione dell'anticorpo nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Il diagramma si riferisce al legame delle proteine NFC101/NFC102 alla regione genomica 5'-terminale a monte dell'ATG rispettivamente dei geni *ZMM4/FLCP128* e *ZMM15/FLCP109*. Risultati analoghi, ma non mostrati, sono stati ottenuti analizzando la regione 3'-terminale dei due geni.

4.2.2. Il livello del trascritto del gene *DLF1* è inalterato nei mutanti *nfc101/nfc102*

Poiché in mais non è stato identificato un possibile omologo funzionale di FLC e poiché nessuno dei MADS-box analizzati costituisce un *target* diretto di NFC101/NFC102, è stato deciso di analizzare se NFC101/NFC102 avessero come *target* diretti altri geni che in mais svolgono un ruolo chiave nella regolazione della transizione fiorale. Uno di questi regolatori è il gene *DLF1*, che codifica per un fattore di trascrizione di tipo bZIP (basic Leu zipper) (Muszynski *et al.*, 2006). È stato analizzato il livello di trascritto del gene *DLF1* nel tessuto MA di piante selvatiche e di piante mutanti *nfc101/nfc102* campionate allo stadio di sviluppo V3/V4.

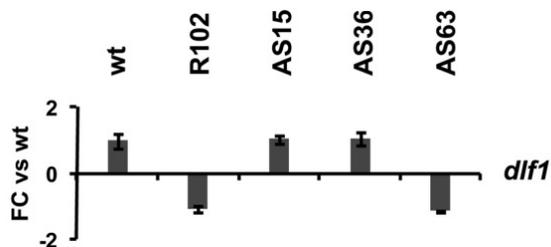


Figura 3 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR del trascritto del gene *DLF1* nel tessuto MA, di piante mutanti *nfc101/nfc102* e selvatiche cresciute fino allo stadio V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA di *DLF1* normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard.

I risultati indicano che il livello di espressione di *DLF1* nel tessuto MA delle linee mutanti non subisce alcuna variazione rispetto alla pianta selvatica (Figura 3), indicando che *DLF1* non costituisce un gene bersaglio delle proteine NFC101/NFC102 di mais.

4.2.3. L'espressione del gene *Id1* è negativamente regolata dalle proteine NFC101/NFC102

Un altro regolatore chiave della transizione fiorale in linee di mais temperato è *Id1*. Per indagare l'esistenza di una regolazione di *Id1* da parte di NFC101/NFC102, è stata analizzata la sua espressione nel tessuto MA nelle quattro linee transgeniche rispetto alla linea selvatica.

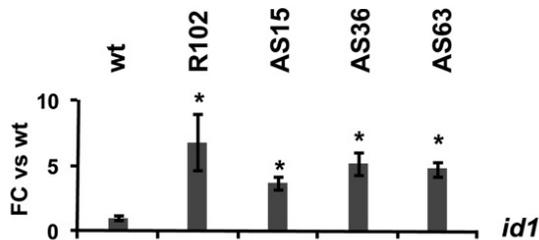


Figura 4 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR del trascritto del gene *Id1* nel tessuto MA, di piante cresciute mutanti *nfc101/nfc102* e selvatiche cresciute fino allo stadio V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA di *Id1* normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

I risultati indicano che la sotto-espressione di *nfc101/nfc102* correla con un aumento statisticamente significativo del livello di trascritto del gene *Id1* rispetto al controllo (Figura 4). È stato, inoltre, verificato se la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* correla con l'induzione dell'espressione ectopica di *Id1* nella parte fotosinteticamente attiva della foglia, corrispondente al tessuto denominato LB, dove *Id1* non è normalmente espresso. I risultati indicano che, neppure eseguendo una RT-PCR ad elevato numero di cicli, si rileva la presenza di ampliconi corrispondenti al trascritto *Id1* nella foglia matura di mais (Figura 5). Le analisi dimostrano, pertanto, che il gene *Id1* viene negativamente regolato dalle proteine NFC101/NFC102, ma solo nella parte immatura della foglia.

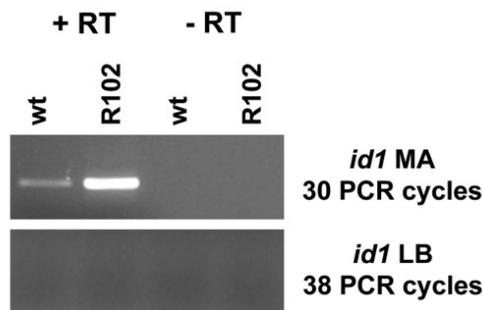


Figura 5 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro, rappresentante gli ampliconi ottenuti dopo una reazione di PCR condotta con un numero di cicli prestabiliti (30 e 38) per rilevare la banda corrispondente al trascritto di *Id1* nei tessuti MA e LB di piante selvatiche e di piante mutanti R102. L'RNA è stato estratto dai tessuti indicati da piante allo stadio di sviluppo V3/V4. +RT e -RT indicano, rispettivamente, l'aggiunta dell'enzima trascrittasi inversa alla reazione di sintesi del cDNA.

Per valutare se tale regolazione è determinata da un legame diretto delle proteine NFC101/NFC102 al locus genico di *Id1*, è stata estratta la cromatina dal tessuto MA e dal tessuto LB di piante selvatiche e di piante mutanti R102, cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Gli immunoprecipitati, ottenuti mediante un saggio di ChIP con l'anticorpo anti-AtFVE, sono stati quantificati mediante real-time qRT-PCR. La real-time qRT-PCR è stata eseguita utilizzando *primer combination* specifiche per due regioni del *locus* genico *Id1*: la regione 5'-terminale, localizzata a monte dell'ATG e la regione 3'-terminale (vedere Figura X nelle Informazioni supplementari.).

I risultati indicano che nelle piante selvatiche esiste un legame diretto di NFC101/NFC102 a livello della regione 5'-terminale del gene *Id1*, in entrambe le tipologie di tessuto analizzate. Come conferma di tale dato, è stato osservato che il legame è abolito nella linea mutante R102. Al contrario, non è stata evidenziata l'esistenza di un legame diretto delle proteine NFC101/NFC102 a livello della regione 3'-terminale del gene *Id1*.

Poiché in *Arabidopsis* è stato osservato che FVE interagisce con le HDAC del tipo Rpd3, è stato verificato se anche il legame di NFC101/NFC102 alla regione 5'-terminale di *Id1* comporta il reclutamento di questi enzimi.

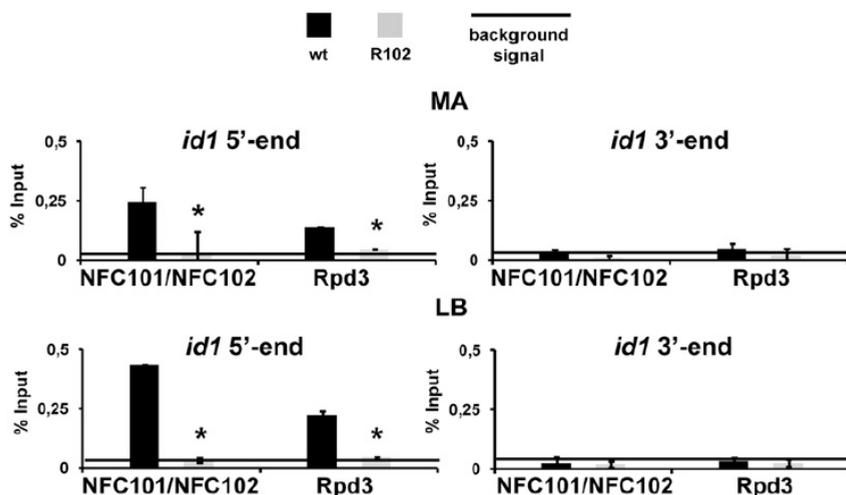


Figura 6 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato a livello della regione 5'-terminale e della regione 3'-terminale del gene *Id1* sia nel tessuto MA che nel tessuto LB di mutanti R102 e di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato rispettivamente con anticorpi anti-AtFVE e anti-Rpd3 rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

I dati indicano che le HDAC del tipo Rpd3 risultano legate alla stessa regione 5'-terminale del gene *Id1* alla quale si legano le proteine NFC101/NFC102 e che questo legame viene abolito nel mutante *nfc101/nfc102* (Figura 6). Questa osservazione suggerisce che le

HDAC vengano reclutate a livello del gene *Id1* proprio dalle proteine NFC101/NFC102.

Per determinare se il legame del complesso NFC101/NFC102-Rpd3 induce la variazione di particolari modifiche istoniche a livello della regione 5'-terminale di *Id1*, sono stati analizzati diversi marchi cromatinici.

La cromatina estratta dai tessuti MA e LB delle piante mutanti R102 e delle piante selvatiche è stata sottoposta a saggi di immunoprecipitazione utilizzando anticorpi specifici per i) l'istone H3 in cui la lisina 9 o 14 sono acetilate (H3ac), ii) l'istone H3 in cui la lisina 4 è di-metilata (H3K4me2) e iii) l'istone H3 in cui la lisina 27 è tri-metilata (H3K27me3). Queste modifiche istoniche sono state scelte perché comprendono marcatori usualmente localizzati in geni e correlati a una cromatina trascrizionalmente attiva (H3ac e H3K4me2) o silente (H3K27me3) (Lauria e Rossi, 2011). Inoltre, studi svolti in *Arabidopsis* hanno indicato che FVE interagisce con HDAC del tipo Rpd3, che hanno come substrato H3ac, istone demetilasi come FLD, che altera il livello di H3K4me2 e istone metiltransferasi del complesso PRC2, che determina l'accumulo di H3K27me3 (Gu *et al.*, 2011; Pazhouhandeh *et al.*, 2011).

Gli immunoprecipitati sono stati quantificati mediante real-time qRT-PCR, utilizzando la combinazione di *primer* specifica per la regione genica di *Id1* in esame.

I risultati indicano che nel tessuto MA del mutante R102, ma non nel tessuto LB, si assiste ad un aumento statisticamente significativo dei marchi istonici di tipo attivante H3ac e H3K4me2. In nessuno dei

tessuti analizzati si osserva, al contrario, alcuna variazione del marchio epigenetico repressivo H3K27me3 (Figura 7).

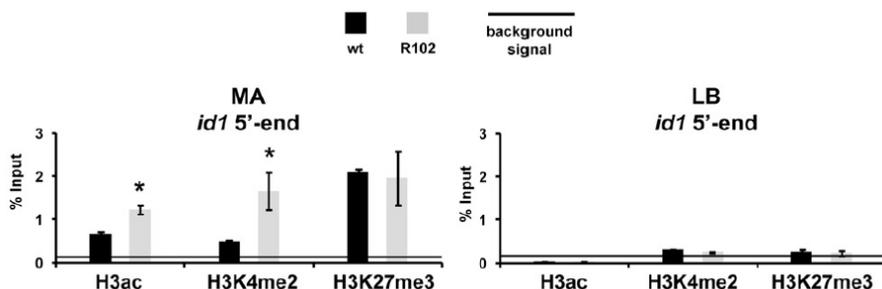


Figura 7 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato a livello della regione 5'-terminale del gene *Id1* rispettivamente nel tessuto MA e LB campionati da piante mutanti R102 e da piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato con gli anticorpi indicati rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

Complessivamente, i dati indicano che il complesso NFC101/NFC102-Rpd3 si lega direttamente alla regione 5'-terminale del gene *Id1* sia nel tessuto MA che nel tessuto LB. Tuttavia, solo nella foglia immatura l'abolizione di questo legame determina la formazione di specifici pattern di modifiche della cromatina e la sovra-espressione di *Id1*.

4.2.4 I geni *ZCN8* e *ZCN7* codificano per diverse tipologie di trascritti

Uno dei principali target di FVE in *Arabidopsis* è il florigeno FT (Pazhouhandeh *et al.*, 2011). Quindi, nel nostro lavoro si è analizzato se nei mutanti *nfc101/nfc102* fosse alterata l'espressione dei putativi florigeni di mais. Prima di fare questo, però, è stato analizzato più in dettaglio i trascritti prodotti dai putativi florigeni di mais, che sono il gene *ZCN8* e il suo paralogo *ZCN7* (Danilevskaya *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011).

Studi effettuati dal gruppo di Olga Danilevskaya (2008b) hanno dimostrato che il gene *ZCN8* è espresso come una “miscela” di trascritti processati e non-processati. Nelle foglie immature è trascritta solo la forma non-processata. Gli autori hanno, inoltre, rilevato la presenza di un paralogo di *ZCN8*, denominato *ZCN7*, il quale mostra il 95% di identità con la sequenza codificante di *ZCN8* e l'87% con la sua sequenza genomica. Mediante saggi di RT-PCR essi hanno dimostrato che *ZCN7* viene trascritto solo come RNA non-processato. Allo scopo di verificare se nei materiali impiegati per questo studio si osservano gli stessi risultati riportati da Danilevskaya *et al* (2008a), sono state effettuate le stesse RT-PCR con le medesime combinazioni di *primer*, che localizzano rispettivamente a monte del sito di inizio della trascrizione (*ZCN8*-1 e *ZCN7*-1) e a cavallo del codone di stop (*ZCN8*-2 e *ZCN7*-2). I risultati ottenuti per i tessuti denominati MA e LB confermano quanto osservato dagli autori citati (Figura 8 e Figura 9). Gli stessi risultati si ottengono anche impiegando i tessuti denominati “foglia immatura” e “foglia matura” (dati non mostrati).

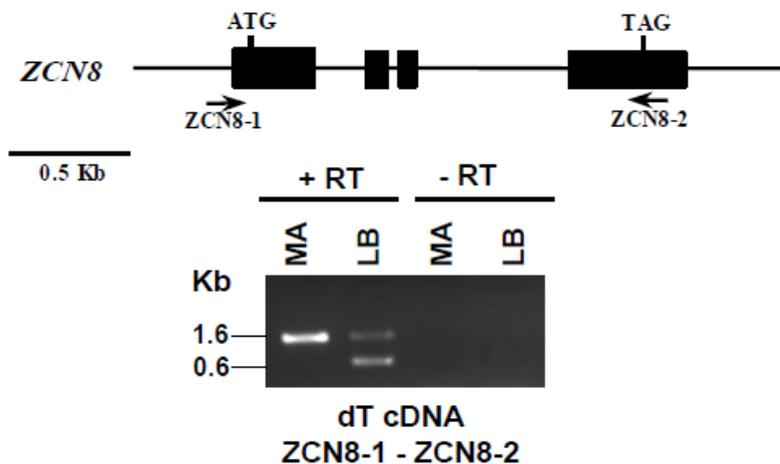


Figura 8 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro rappresentante gli ampliconi corrispondenti ai trascritti processati e non-processati del gene *ZCN8*. La RT-PCR è stata condotta su cDNA sintetizzato utilizzando *primer* oligo(dT). L'RNA è stato estratto dai tessuti MA e LB di piante selvatiche allo stadio di sviluppo V3/V4. +RT e -RT indicano, rispettivamente, l'aggiunta o meno dell'enzima trascrittasi inversa alla reazione di sintesi del cDNA. Nella figura sopra, i box neri e le linee rappresentano, rispettivamente, gli esoni e gli introni del gene *ZCN8*. La posizione dei *primer* ZCN8-1 e ZCN8-2 utilizzati in RT-PCR sono indicati rispettivamente con le frecce.

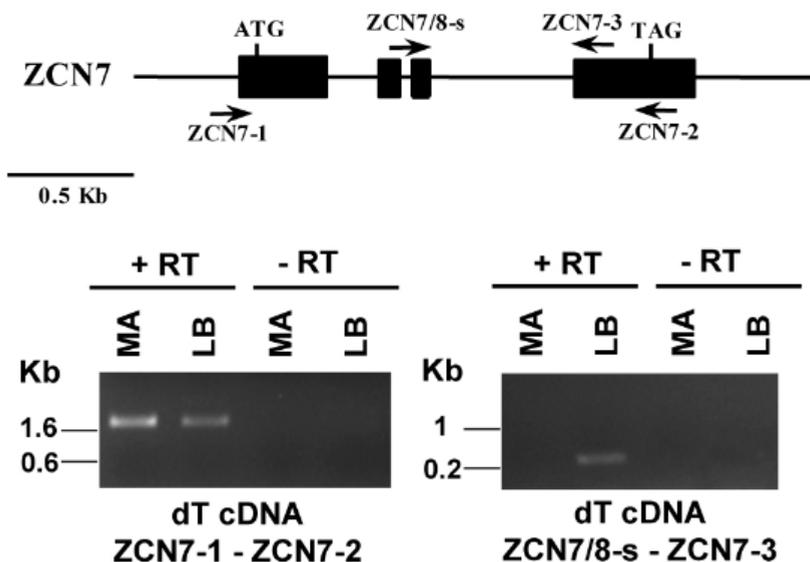


Figura 9 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro rappresentante gli ampliconi corrispondenti ai trascritti non-processati (a sinistra) e processati (a destra) del gene *ZCN7*. La RT-PCR è stata condotta su cDNA sintetizzato utilizzando primer oligo(dT). L'RNA è stato estratto dai tessuti MA e LB di piante selvatiche allo stadio di sviluppo V3/V4. +RT e -RT indicano, rispettivamente, l'aggiunta o meno dell'enzima trascrittasi inversa alla reazione di sintesi del cDNA. Nella figura sopra, i box neri e le linee rappresentano, rispettivamente, gli esoni e gli introni del gene *ZCN7*. La posizione dei primer ZCN7-1, ZCN7-2, ZCN7/8-s e ZCN7-3 utilizzati in RT-PCR sono indicati rispettivamente con le frecce.

Poiché il trascritto processato di *ZCN7* potrebbe essere prodotto a livelli molto bassi, abbiamo, successivamente eseguito saggi di RT-PCR con un elevato numero di cicli e con *primer* specifici per la forma processata di *ZCN7* (ZCN7/8-s e ZCN7-3). Sorprendentemente, i risultati hanno mostrato la presenza, di un amplicone corrispondente alla forma processata di *ZCN7* nel tessuto fogliare maturo (Figura 9).

Per identificare i trascritti prodotti da *ZCN8* e da *ZCN7* nei tessuti MA e LB di mais, abbiamo eseguito un saggio di northern blot utilizzando sonde a RNA specifiche per i trascritti senso e antisenso di *ZCN8* e *ZCN7*. Poiché le sequenze dei due geni sono altamente omologhe, non è stato possibile disegnare delle sonde a RNA specifiche per ciascuno dei due geni. Quindi, poiché le sonde sono rappresentate principalmente dal quarto esone di *ZCN8* e *ZCN7*, esse possono ibridare simultaneamente con il trascritto processato (di circa 600 nucleotidi) e con il trascritto non-processato (di circa 1600 nucleotidi) di *ZCN8/ZCN7* (Figura 10).

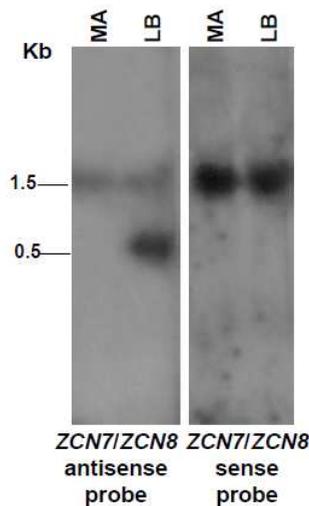


Figura 10 – Northern blotting su RNA estratto dal tessuto MA e dal tessuto LB di piante selvatiche allo stadio di sviluppo V3/V4. L'RNA è stato ibridato rispettivamente con sonde specifiche per il trascritto senso e il trascritto antisenso di *ZCN8* e *ZCN7*. Poiché la sonda è localizzata quasi interamente nel quarto esone, essa ibrida sia con il trascritto processato (circa 600 nct) sia con il trascritto non-processato (circa 1600 nct) di *ZCN8* e di *ZCN7*.

Dai risultati di northern blot si osserva che il trascritto in orientamento senso e processato dei geni *ZCN8/ZCN7* è prodotto solo nella foglia matura (LB). Il trascritto antisenso, al contrario, è prodotto sia nel tessuto LB sia nel tessuto MA e sembra essere costituito esclusivamente da trascritto non-processato. Le forme senso processate dei trascritti sono anch'esse presenti in entrambi i tessuti analizzati, sebbene il loro livello sia nettamente inferiore rispetto all'RNA antisenso non-processato, che sembra quindi costituire la forma predominante di RNA non-processato sia in LB che in MA.

Poiché i saggi di northern blot non ci hanno consentito di distinguere tra i trascritti prodotti da *ZCN8* e da *ZCN7*, il passo successivo è stato di eseguire una *strand-specific* RT-PCR con combinazioni di *primer* specifiche per l'uno o per l'altro *locus*. I risultati ottenuti dalla *strand-specific* RT-PCR sono sintetizzati nella Figura 11. Essi, in accordo con quanto emerso dagli esperimenti di northern blot (Figura 10), dimostrano che il trascritto processato dei geni *ZCN7* e *ZCN8* è sintetizzato solo nella foglia matura ed è costituito esclusivamente da RNA senso. La forma non-processata dei trascritti è, invece, presente sia in MA sia in LB, ed è prodotta principalmente come trascritto antisenso.

La figura 12 raffigura in maniera schematica i geni *ZCN8* e *ZCN7* e i relativi trascritti prodotti: il trascritto senso processato, il trascritto senso non-processato e, infine, il trascritto antisenso.

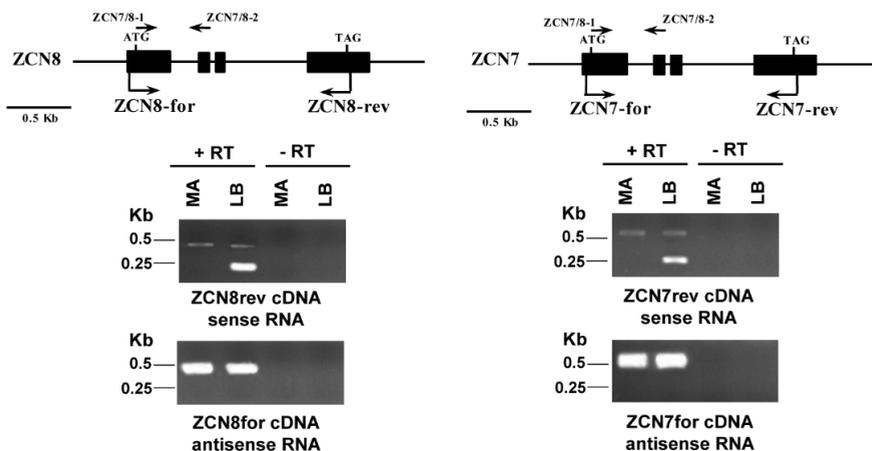


Figura 11 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro rappresentante gli ampliconi corrispondenti ai trascritti senso processato, senso non-processato e antisense non-processato dei geni *ZCN8* e *ZCN7*. I trascritti di *ZCN8* e di *ZCN7* sono stati amplificati mediante i primer *ZCN7/8-1* e *ZCN7/8-2*, localizzati, rispettivamente, nel primo e nel secondo esone. La RT-PCR è stata condotta su cDNA sintetizzato utilizzando primer specifici per i trascritti senso (*ZCN8-for* e *ZCN7-for*) e per i trascritti antisense (*ZCN8-rev* e *ZCN7-rev*) di *ZCN8* e di *ZCN7*. L'RNA è stato estratto dai tessuti MA e LB di piante selvatiche allo stadio di sviluppo V3/V4. +RT e –RT indicano, rispettivamente, l'aggiunta o meno dell'enzima trascrittasi inversa alle reazioni di sintesi del cDNA. Nella figura sopra, i box neri e le linee rappresentano, rispettivamente, gli esoni e gli introni dei geni *ZCN8* e *ZCN7*. La posizione dei primer utilizzati per la sintesi del cDNA (*ZCN8-for*, *ZCN8-rev*, *ZCN7-for* e *ZCN7-rev*) e per la RT-PCR (*ZCN7/8-1* e *ZCN7/8-2*) sono indicati con le frecce.

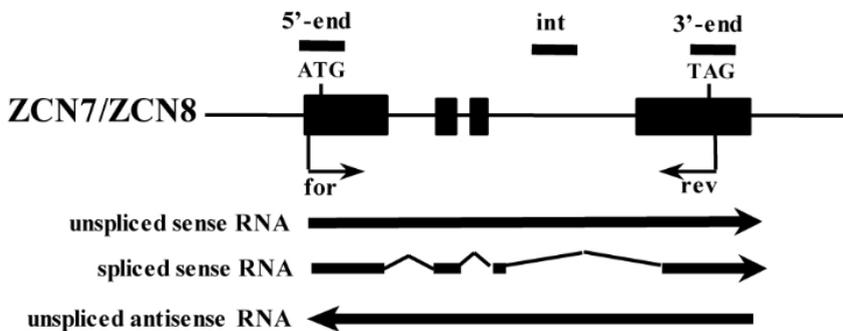


Figura 12 – Schema della struttura dei geni *ZCN8* e *ZCN7* e dei loro tre rispettivi trascritti. I box neri rappresentano gli esoni, le linee gli introni. I primer forward e reverse utilizzati rispettivamente per la sintesi dei trascritti senso ed antisense sono rappresentati dalle frecce. Sono, inoltre, indicate le tre regioni dei geni *ZCN8* e *ZCN7* analizzate nei saggi di ChIP (5'-terminale, interna e 3'-terminale).

Per indagare la natura dei trascritti prodotti dai geni *ZCN8* e *ZCN7*, le sequenze dei cDNA derivanti rispettivamente dai trascritti senso e antisense non-processati sono state clonate e i cloni prodotti sono stati sequenziati. Il cDNA prodotto dal trascritto senso non-processato corrisponde perfettamente alla sequenza del DNA genomico di *ZCN8* e di *ZCN7*, indicando che questo trascritto contiene, oltre agli esoni, anche tutti gli introni, come predetto dal sequenziamento del cDNA derivato dal RNA processato. La stessa cosa si osserva per i cDNA derivati dai trascritti antisense di *ZCN8* e di *ZCN7*. Tuttavia, le sequenze trascritte in orientamento antisense contengono solo brevi ORF (*open reading frame*) (vedere Figura X in Informazioni supplementari), che non mostrano similarità con nessuna delle proteine note. Questa osservazione suggerisce, quindi, che i trascritti

antisenso di *ZCN8* e di *ZCN7* costituiscano lunghe molecole di RNA non codificante, la cui funzione è oggetto di indagine.

4.2.5. Analisi dell'espressione di *ZCN8* e di *ZCN7* nei mutanti *nfc101/nfc102*

Per investigare se anche in mais i florigeni costituiscono un bersaglio delle proteine NFC101/NFC102, abbiamo valutato se la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* correla con una variazione del trascritto del putativo florigeno di mais *ZCN8* (Lazakis *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011) e del suo paralogo *ZCN7*. L'indagine si è focalizzata, in particolare, su tutti e tre i trascritti prodotti dai geni *ZCN8* e *ZCN7* per valutare se la loro espressione è diversamente modulata.

Per prima cosa, è stato paragonato il livelli di RNA processato di *ZCN8* e di *ZCN7* nella foglia matura di tutte e quattro le linee transgeniche rispetto al rispettivo livello nella pianta selvatica.

I risultati di real-time qRT-PCR indicano che la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* correla con un aumento statisticamente significativo del livello del trascritto senso processato di *ZCN8* in tutte le quattro linee con soppressione di *nfc101/nfc102* rispetto al controllo. Il trascritto senso processato di *ZCN7* non è, al contrario, influenzato dalla sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* (Figura 13).

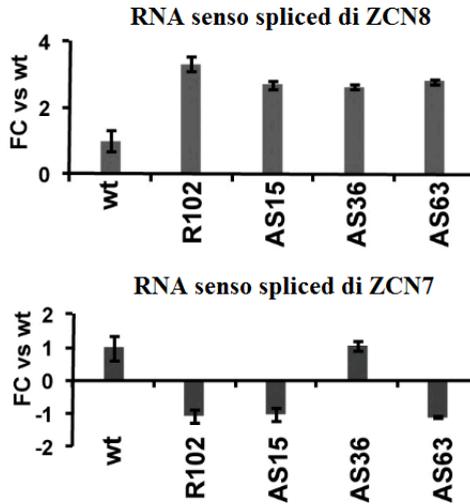


Figura 13 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti senso processato rispettivamente del gene *ZCN8* e del gene *ZCN7* nel tessuto LB, di piante transgeniche *nfc101/nfc102* e di piante selvatiche campionate allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA di *ZCN8* e di *ZCN7* normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard.

Dopo aver dimostrato che solo il trascritto senso di *ZCN8* è regolato dalle proteine NFC101/NFC102, è stato analizzato se la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* correla con variazioni staticamente significative del livello dei trascritti senso non-processato e antisenso di *ZCN8* e di *ZCN7*. Tale analisi è stata condotta su cDNA specifico, rispettivamente, per la forma senso e la forma antisenso del trascritto sia di *ZCN8* che di *ZCN7*, a partire da RNA estratto dalla foglia

matura (LB) e dal tessuto arricchito di area meristemica (MA) di piante mutanti R102 e di piante selvatiche.

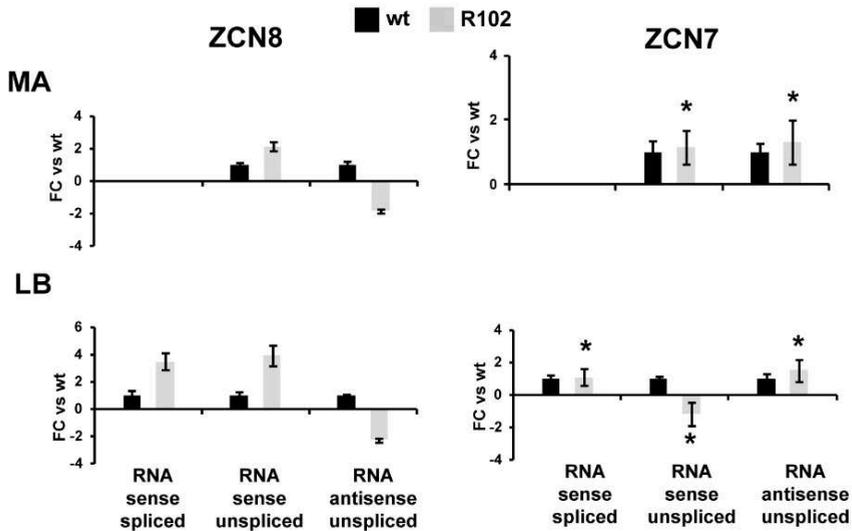


Figura 14 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti senso processato, senso non-processato e antisense non-processato, rispettivamente, del gene *ZCN8* e del gene *ZCN7*. Tale quantificazione è stata eseguita nei tessuti MA e LB di piante transgeniche R102 e di piante selvatiche campionate allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello dei singoli trascritti normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

Gli esperimenti di real-time qRT-PCR indicano che l'aumento del trascritto senso processato di *ZCN8* nel tessuto LB di piante mutanti R102 correla con l'aumento del trascritto non-processato e con la riduzione del trascritto antisenso. Lo stesso risultato si osserva nel tessuto MA, con l'eccezione del trascritto senso processato che in tale tessuto non è prodotto (Figura 14). Inoltre, i dati di real-time qRT-PCR confermano ulteriormente che la mutazione *nfc101/nfc102* influenza specificamente l'espressione del gene *ZCN8*, poiché non si rilevano variazioni statisticamente significative riguardo i trascritti del gene *ZCN7* (Figura 14).

Mediante saggi di immunoprecipitazione della cromatina quantificati tramite esperimenti di real-time qRT-PCR con combinazioni di *primer* specifiche, è stata valutata la capacità delle proteine NFC101/NFC102 di legare direttamente la regione 5'-terminale, la regione interna e la regione 3'-terminale di *ZCN8* (indicate in figura 12). Sorprendentemente, NFC101/NFC102 legano unicamente l'estremità 3'-terminale del gene *ZCN8*, in una regione a cavallo del codone di stop e, contrariamente a quanto osservato per il gene *Id1*, tale legame non coinvolge il reclutamento della deacetilasi di tipo Rpd3 (Figura 15).

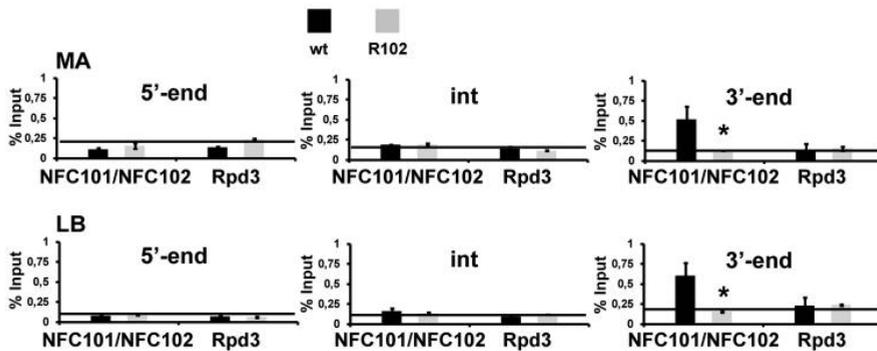


Figura 15 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato rispettivamente a livello delle regioni 5'-terminale, interna e della regione 3'-terminale, del gene *ZCN8* nei tessuti MA e LB di piante mutanti R102 e di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato con anticorpi anti-AtFVE e anti-Rpd3 rispettivamente rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

Infine, l'analisi della distribuzione dei marchi istonici a livello delle tre regioni geniche di *ZCN8* indica un aumento statisticamente significativo dei livelli H3ac e di H3K4me2 lungo l'intera sequenza genica di *ZCN8* nel tessuto MA dei mutanti *nfc101/nfc102* rispetto allo stesso tessuto campionato da piante selvatiche. Al contrario, nella foglia matura (LB), non si osservano differenze statisticamente significative relative alla distribuzione di questi marchi cromatinici (Figura 16).

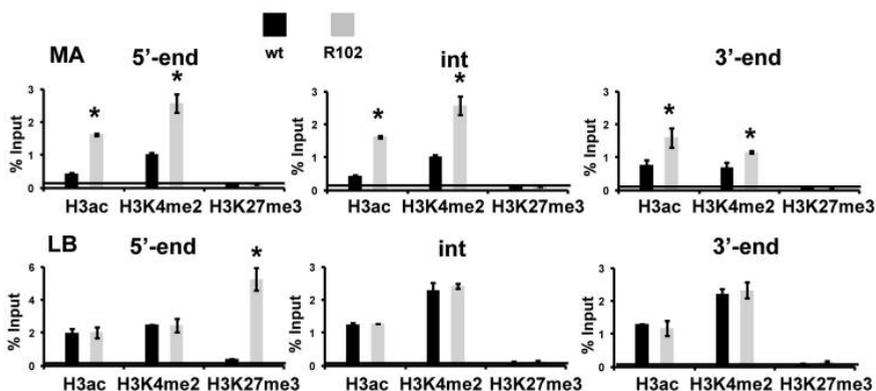


Figura 16 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato a livello delle regioni 5'-terminale, interna e 3'-terminale, rispettivamente, del gene *ZCN8* nei tessuti MA e LB di mutanti R102 e di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato rispettivamente con anticorpi anti-H3ac, anti-H3K4me2 e anti-H3K27me3 rispetto al DNA totale (% Input).

La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

Tuttavia, è molto interessante osservare che il marchio istonico H3K27me3, che è assente lungo tutta la regione genica di *ZCN8* sia in MA che in LB della pianta selvatica (Figura 17), mostra un elevato accumulo nella regione 5'-terminale in corrispondenza della sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102*. Tale accumulo è riscontrabile soltanto nel tessuto LB (Figura 16). La deposizione del marchio istonico H3K27me3, a livello della regione genica 5'-terminale del

gene *ZCN8*, sembra essere, quindi, controllata negativamente e in maniera tessuto-specifica da *NFC101/NFC102*.



Figura 17 – Diagramma a barre che mostra il livello di H3K27me3 nella regione 5'-terminale di *ZCN8* rispettivamente immatura nel tessuto MA e nel matura tessuto LB di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato con anticorpi anti-H3K27me3 rispetto al DNA totale (% Input).

La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione dell'anticorpo nei saggi di ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

4.3. Meccanismi epigenetici mediati da *Id1* e coinvolti nella regolazione dei florigeni di mais

4.3.1. *Id1* regola positivamente la trascrizione di *ZCN8* e di *ZCN7*

Mediante la caratterizzazione dei mutanti *nfc101/nfc102* è stato dimostrato che, in linee di mais temperato, le modifiche della cromatina svolgono un ruolo importante nel modulare l'espressione di regolatori chiave della fioritura. Per ampliare ulteriormente lo studio della regolazione epigenetica della fioritura nelle piante temperate, si è

cercato, in seguito, di verificare l'ipotesi secondo la quale *Id1* attiverrebbe l'espressione dei florigeni proprio mediante un meccanismo epigenetico.

Per prima cosa, sono stati condotti degli esperimenti per valutare l'espressione dei diversi trascritti di *ZCN8* e di *ZCN7* nella foglia immatura e nella foglia matura dei mutanti *idl*, comparati ai rispettivi livelli nella pianta selvatica. Tali tessuti sono stati scelti poiché *Id1* è espresso nella parte di foglia fotosinteticamente inattiva, mentre le proteine *ZCN8* e *ZCN7* vengono prodotte nella foglia matura di mais. È stato, quindi, estratto l'RNA rispettivamente dalla lamina fogliare della settima foglia (tessuto denominato "foglia matura") e dal tessuto non fotosintetico dell'ottava foglia più interna (tessuto denominato "foglia immatura") di piante cresciute fino allo stadio di sviluppo V4/V5.

I risultati indicano che, in assenza del gene *Id1* funzionante, i trascritti di *ZCN8* e di *ZCN7* mostrano un andamento completamente opposto a quanto osservato nei mutanti *nfc101/nfc102* per i tre trascritti di *ZCN8*. Nei mutanti *idl* si assiste, infatti, alla diminuzione del trascritto senso processato e senso non-processato sia di *ZCN8* sia di *ZCN7* e alla sovra-espressione dei loro trascritti antisenso (Figura 18).

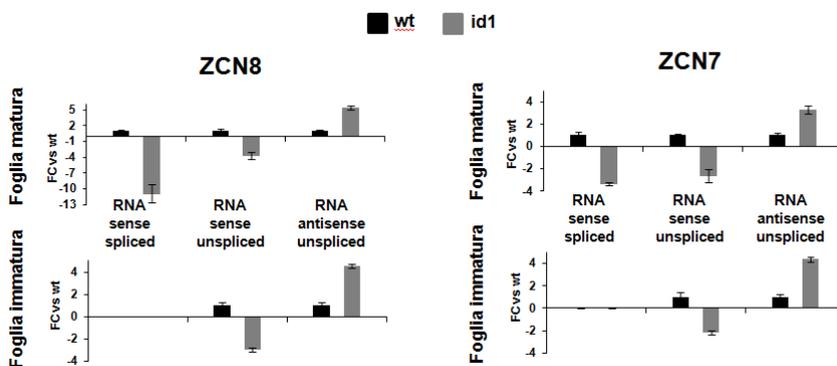


Figura 18 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti senso processato, senso non-processato e antisense non-processato rispettivamente del gene *ZCN8* e del gene *ZCN7*, nei mutanti *id1* e nelle piante selvatiche. L'RNA è stato estratto rispettivamente dalla settima foglia e dall'ottava foglia più interna di piante mutanti nel gene *id1* e di piante selvatiche cresciute allo stadio di sviiluppo V4/V5 (esso costituisce approssimativamente lo stesso stadio indicato da Lazakis *et al.*, (2011) per lo studio dell'espressione di *ZCN8* nei mutanti *id1*). Il diagramma a barre rappresenta il livello dei singoli trascritti normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard.

4.3.2. L'azione di *Id1* risulta associata alla variazione di modifiche della cromatina nei loci *ZCN8* e *ZCN7*

Per verificare se l'attività di *Id1* correla con modifiche della cromatina nei loci *ZCN8* e *ZCN7*, sono stati effettuati saggi di ChIP usando anticorpi specifici per diverse tipologie di modifiche istoniche. Nello specifico, sono stati utilizzati anticorpi specifici per i) H3ac, ii)

H3K27me3, iii) l'istone H3 in cui la lisina 4 è tri-metilata (H3K4me3), iv) l'istone H3 in cui la lisina 36 è di-metilata (H3K36me2), v) H3K4me2. Queste modifiche istoniche sono state scelte perché comprendono marcatori usualmente localizzati in geni e correlati a una cromatina trascrizionalmente attiva, tranne H3K27me3 che correla a una cromatina trascrizionalmente silente (Lauria e Rossi, 2011) vi). È stato utilizzato, inoltre, l'anticorpo che riconosce l'estremità carbossi-terminale dell'istone H3 indipendentemente dalle modifiche istoniche presenti (H3C-ter), la cui analisi serve per misurare il livello dell'istone H3 da usare come un "indicatore" della densità nucleosomica.

Gli immunoprecipitati sono stati analizzati in real-time qRT-PCR mediante *primer combination* che si localizzano in specifiche regioni di *ZCN8* e di *ZCN7*, come schematizzato in Figura 19.

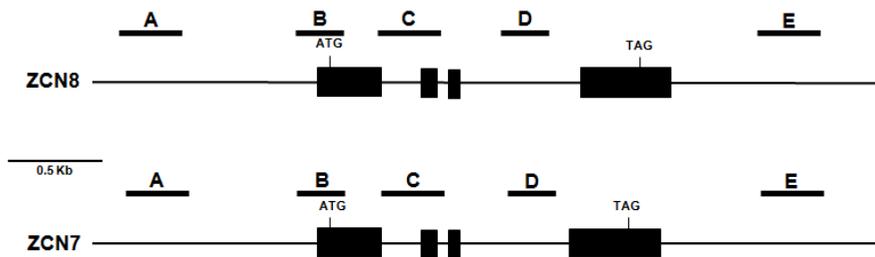
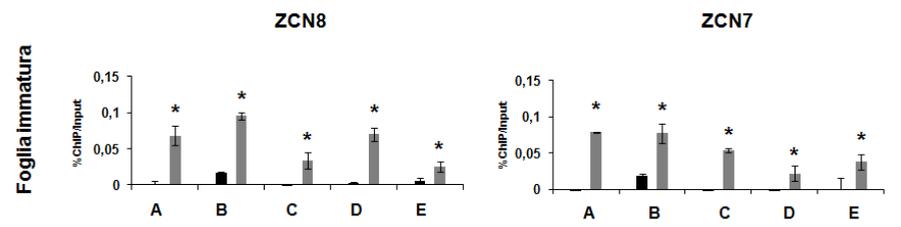
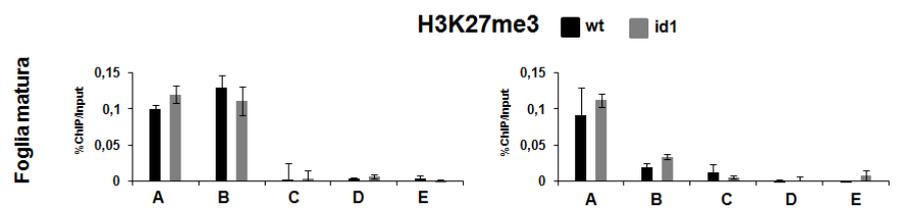
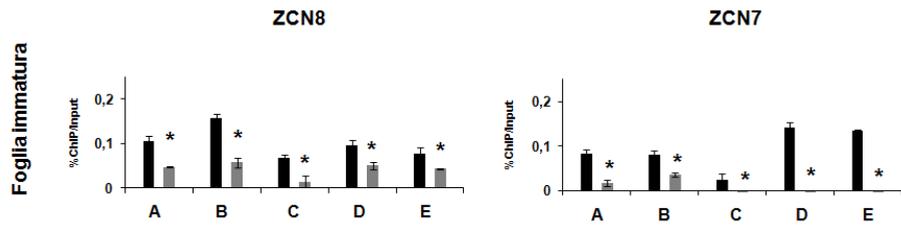
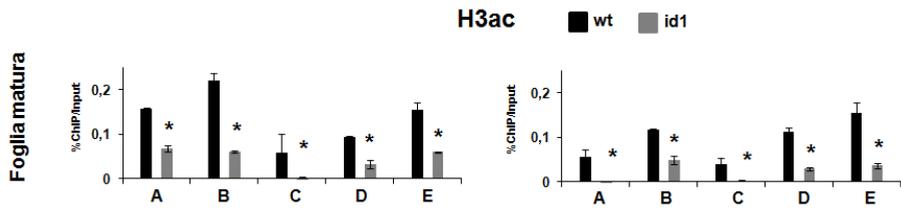
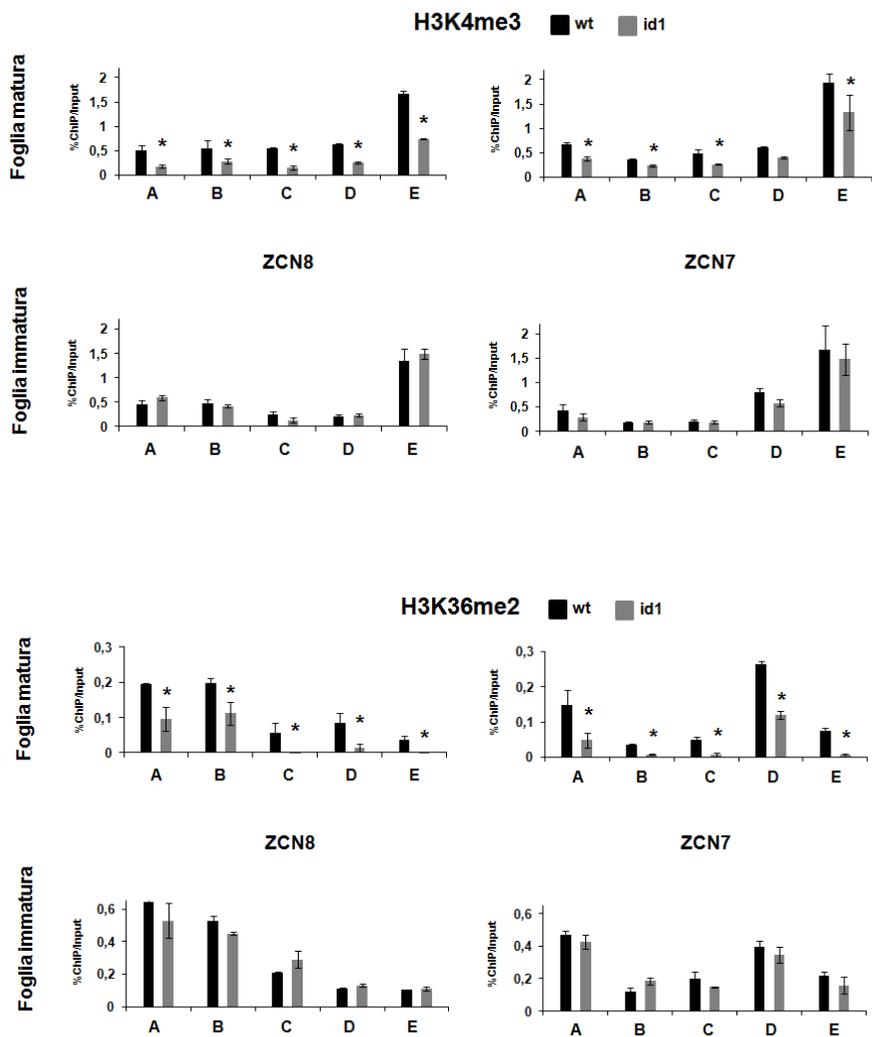


Figura 19 – I box neri e le linee rappresentano, rispettivamente, gli esoni e gli introni dei geni *ZCN8* e *ZCN7*. Le posizioni delle rispettive regioni analizzate mediante saggi di immunoprecipitazione della cromatina sono indicate con dei tratti denominati con diverse lettere dell'alfabeto (da "A" a "E" per *ZCN8* e da "A" a "E" per *ZCN7*).





a cui è stato sottratto il valore del segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione dei rispettivi anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

I risultati ottenuti indicano che, in base al loro “comportamento” nei mutanti *idl* rispetto al controllo, le modifiche istoniche analizzate possono essere suddivise in quattro gruppi.

Il primo gruppo è costituito da H3ac. Nei mutanti *idl* si osserva una riduzione del livello di questa modifica istonica in tutte le regioni analizzate sia di *ZCN8* che di *ZCN7* già nella foglia immatura, dove *Idl* è espresso. Tale variazione viene mantenuta anche nel tessuto fogliare maturo.

Il secondo gruppo riguarda H3K27me3, che mostra una diminuzione solo nella foglia immatura dei mutanti *idl*, poiché il suo livello nella foglia matura torna ad essere paragonabile al livello rilevato nel controllo.

Il terzo gruppo comprende, invece, le modifiche istoniche H3K4me3 e H3K36me2, il livello delle quali resta inalterato nella foglia immatura dei mutanti *idl* rispetto al controllo, ma aumenta nella foglia matura, indicando probabilmente che la loro variazione non è mediata direttamente da *Idl*, poiché esso non è espresso nella foglia matura.

Infine, il quarto gruppo è costituito da H3K4me2 e dal livello totale dell'istone H3, misurato con anti-H3Cter: essi non mostrano nessuna variazione nei mutanti *id1*.

È importante sottolineare che, nel complesso, non si osservano differenze tra *ZCN8* e *ZCN7* per le modifiche istoniche analizzate. Inoltre, le variazioni delle modifiche istoniche sopra riportate riguardano sempre tutte e cinque le regioni analizzate sia di *ZCN8* che di *ZCN7*.

Il livello di alcune modifiche istoniche, come H3K4me2 e H3K36me2, indicative di una cromatina trascrizionalmente attiva, è elevato già nel tessuto fogliare immaturo di piante selvatiche. La deposizione di tale marchi nella foglia immatura sembra, quindi, essere indipendente dalla funzionalità di Id1. Tuttavia, tra questi due marchi, solo la deposizione di H3K36me2 nella foglia matura sembra dipendere da Id1, così come il livello di un altro marchio istonico analizzato, H3K4me3. Il livello di H3K4me2 non varia invece né nella foglia matura, né nella foglia immatura dei mutanti *id1* rispetto al controllo. In generale, questi risultati indicano che già nella foglia immatura si assiste alla formazione di cromatina trascrizionalmente attiva che, da un lato, sembra dipendere da Id1 (è il caso di H3ac e H3K27me3) e, dall'altro sembra invece essere indipendente.

È interessante, inoltre, osservare che alcuni marchi istonici analizzati mostrano un accumulo del tutto anomalo rispetto alla loro usuale distribuzione nei geni di mais (Wang *et al.*, 2009). Ad esempio, H3K4me3, che solitamente si localizza nella regione 5'-terminale di un gene, intorno al sito di inizio della trascrizione, in *ZCN8* e in *ZCN7*

tende invece ad accumularsi nella regione situata a valle del sito di terminazione. Inoltre, H3K27me3, che si localizza generalmente a livello del corpo del gene, mostra un peculiare accumulo a livello della regione 5'-terminale dei geni *ZCN8* e *ZCN7*.

In generale, i dati indicano che l'ipotesi secondo la quale Id1 agisca per creare un ambiente cromatinico "competente" alla trascrizione di *ZCN8* e *ZCN7* già nella foglia immatura, conservato poi fino alla formazione del tessuto fogliare maturo dove i florigeni vengono espressi, è confermata solo dall'analisi di alcune modifiche istoniche come H3ac e, in parte, da H3K27me3.

4.4. Effetti della sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* su alcuni elementi trasponibili

4.4.1. La sotto-espressione di *nfc101/nfc102* correla con la sovra-espressione di alcuni elementi trasponibili

In *Arabidopsis* è stato osservato che l'attività di FVE e del suo omologo MSI5 non è limitata al solo meccanismo autonomo di fioritura; essi agiscono, infatti, in complessi multi-proteici effettori del *pathway* RdDM coinvolti nel silenziamento dei trasposoni e di sequenze ripetute (Gu *et al.*, 2011).

Nonostante la regolazione degli elementi trasponibili si discosti dallo studio del *pathway* autonomo di fioritura, si è voluto valutare se, analogamente a FVE di *Arabidopsis*, le proteine NFC101/NFC102 di mais sono coinvolte nella regolazione trascrizionale dei trasposoni.

Per analizzare l'eventuale variazione del livello dei trascritti prodotti dai TE nei mutanti *nfc101/nfc102* di mais, sono state selezionate alcune sequenze che rappresentano le regioni ripetute di differenti tipologie di trasposoni. In particolare, si è scelto di analizzare le sequenze “terminal inverted repeat” (TIR) del trasposone a DNA *Mutator* (Mu) e le regioni “long terminal repeats” (LTR) dei seguenti retrotrasposoni: *Prem2/Ji*, *Cinful/Zeon* e *CRM2*. *Prem2/Ji* appartiene alla superfamiglia *Copia* dei trasposoni LTR, i cui membri si accumulano preferibilmente nelle regioni eucromatiche dei bracci cromosomici (Schnable *et al.*, 2009). *Cinful/Zeon* appartiene invece alla superfamiglia *Gypsy*, i cui membri si concentrano nell'eterocromatina pericentromerica (Schnable *et al.*, 2009). *CRM2*, infine, rappresenta un trasposone centromerico (Schnable *et al.*, 2009). Tutte queste sequenze derivano da trasposoni ad elevato numero di copie, che variano da alcune centinaia, come nel caso di *Mu* e *CRM2*, fino ad alcune migliaia (*Prem2/Ji* e *Cinful/Zeon*) (Baucom *et al.*, 2009; <http://maizetadb.org/>).

In accordo con dati presenti in letteratura, abbiamo osservato che i trasposoni LTR ad elevato numero di copie sono poco o per nulla rappresentati nella frazione poliadenilata dell'RNA, indice del fatto che questi elementi, anche se trascritti, non sono poliadenilati (Hale *et al.*, 2009). Quindi, per identificare qualsiasi trascritto non poliadenilato corrispondente ai TE da noi studiati, abbiamo condotto esperimenti di RT-PCR utilizzando cDNA sintetizzato mediante *random-primer*.

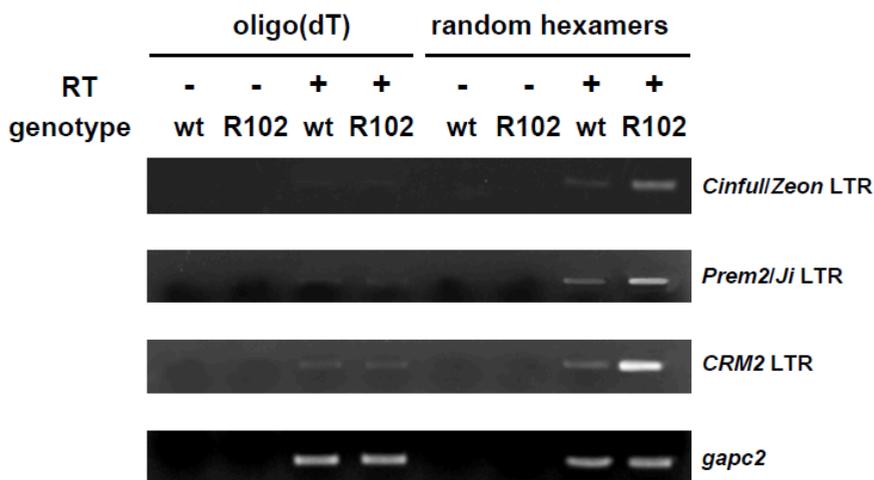


Figura 21 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro che mostra i frammenti amplificati mediante RT-PCR condotta su cDNA sintetizzato rispettivamente con primer oligo(dT) e random primer. L’RNA totale è stato estratto rispettivamente dal tessuto MA di piante selvatiche B73 e di piante mutanti R102, cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. È riportato inoltre il livello del trascritto del gene di riferimento *gapc2* rilevato nelle medesime condizioni e nei medesimi genotipi. La reazione di sintesi del cDNA è stata condotta in presenza (+) o in assenza (-) dell’enzima trascrittasi inversa.

Osservando attentamente la figura 21 si può dedurre che, nel tessuto MA, il livello di trascritto dei trasposoni LTR analizzati è maggiore nei mutanti R102 rispetto al controllo. Esperimenti di real-time qRT-PCR condotti su tutte e quattro le linee transgeniche *nfc101/nfc102*, confermano questo dato. Specificamente, i risultati degli esperimenti condotti su tutte e quattro le linee transgeniche con sotto-espressione di *nfc101/nfc102* indicano che nel tessuto MA si assiste ad un aumento statisticamente significativo del livello dei trascritti prodotti dalle quattro sequenze dei TE analizzati. Al contrario, nel tessuto LB

solo il livello di alcuni trascritti aumenta significativamente e solo in alcune delle quattro linee mutanti (Figura 22).

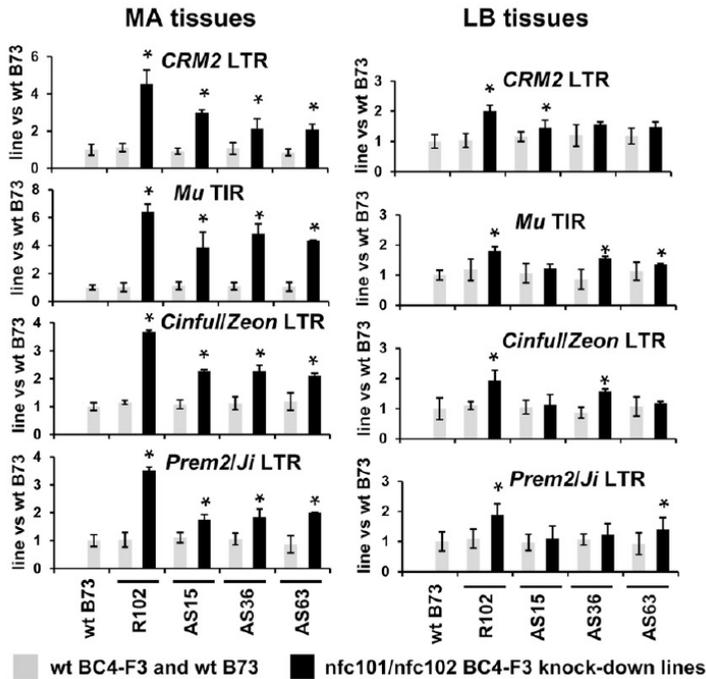


Figura 22 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti prodotti dalle sequenze ripetute dei TE indicati. L’RNA è stato estratto dal tessuto MA e LB di piante cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. I genotipi analizzati sono le quattro linee transgeniche *nfc101/nfc101*, la linea selvatica BC4-F3 e la linea *inbred* B73. Il diagramma a barre rappresenta il livello dei singoli trascritti normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come livello di trascritto nella linea mutante rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica BC4-F3/B73. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

Per escludere che le variazioni del livello dei trascritti prodotti dalle regioni ripetute sia in qualche modo dovuto al genoma ibrido formatosi durante la generazione dei mutanti *nfc101/nfc102*, situazione che notoriamente può attivare i TE, i livelli dei trascritti osservati nei mutanti sono stati paragonati ai rispettivi livelli sia nella linea selvatica B73 che nel segregante selvatico BC4-F3. Da quest'analisi non si riscontrano differenze tra la linea B73 e il segregante selvatico, indicando che l'aumento del livello di espressione dei trascritti nel tessuto MA è direttamente associato con la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102*.

È interessante osservare, inoltre, che nella linea B73 il livello dei trascritti prodotti dalle regioni ripetute è inferiore nella foglia matura rispetto alla foglia immatura (Figura 23). Tale differenza è probabilmente dovuta a un meccanismo di silenziamento dei trasposoni fisiologicamente più debole nel tessuto MA rispetto al tessuto LB, sebbene il motivo sia ancora sconosciuto.

wild-type V3/V4 seedlings

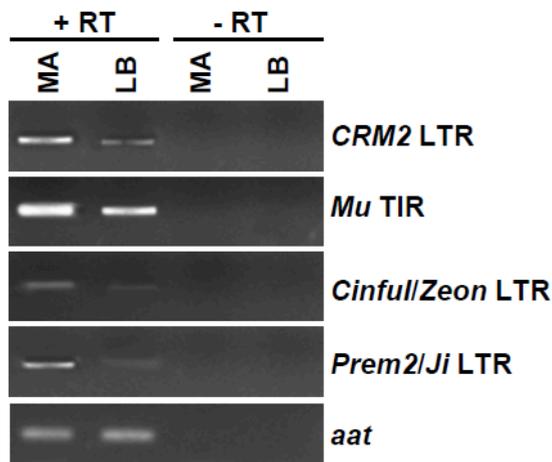


Figura 23 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro che mostra i frammenti amplificati mediante RT-PCR condotta su cDNA sintetizzato con *random primer*. L'RNA totale è stato estratto dal tessuto MA e dal tessuto LB di piante selvatiche B73, cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. È riportato inoltre il livello del trascritto del gene di riferimento *alanina aminotransferasi (aat)* rilevato nelle medesime condizioni e nel medesimo genotipo. L'espressione del gene *aat* è indipendente dal tipo di tessuto e dallo stadio di sviluppo (Li *et al.*, 2010). La reazione di sintesi del cDNA è stata condotta in presenza (+RT) o in assenza (-RT) dell'enzima trascrittasi inversa.

In seguito, è stato verificato se nei mutanti *nfc101/nfc102* di mais veniva influenzata preferibilmente la sintesi dei trascritti senso o dei trascritti antisenso del trasposone *Mu* e dei retrotrasposoni *Prem2/Ji*, *Cinfile/Zeon* e *CRM2*. Esperimenti di RT-PCR, condotti su cDNA sintetizzato specificamente per il trascritto senso e il trascritto antisenso dei rispettivi trasposoni, hanno dimostrato, innanzitutto, che le sequenze ripetute analizzate producono entrambe le tipologie di

trascritto sia nella linea selvatica sia nel mutante R102 (Figura 24). Inoltre, sia il trascritto senso sia il trascritto antisenso sono più abbondanti nel tessuto MA campionato dalla linea mutante R102 rispetto allo stesso tessuto campionato dalla pianta selvatica (Figura 24).

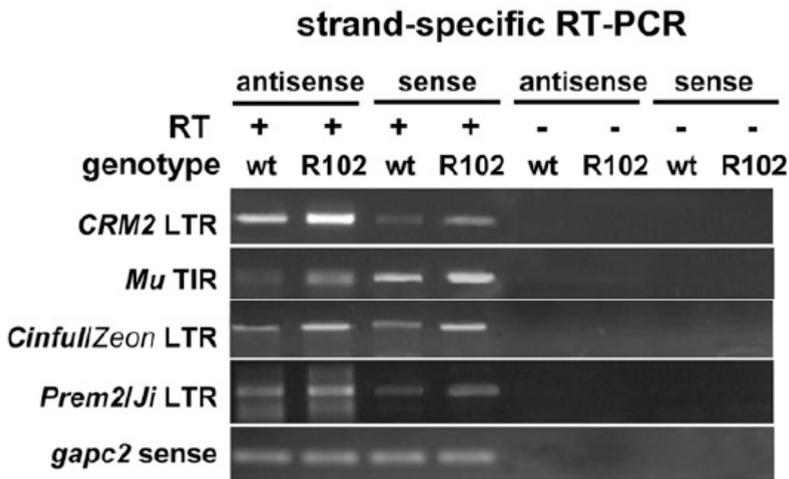


Figura 24 – Gel di agarosio colorato con etidio bromuro che mostra i frammenti amplificati mediante RT-PCR condotta su cDNA sintetizzato con primer specifici rispettivamente per il trascritto senso e il trascritto antisenso dei quattro TE analizzati. L’RNA totale è stato estratto dalla foglia immatura (MA) di piante selvatiche e di piante R102, cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. È riportato inoltre il livello del trascritto senso del gene di riferimento *gapc2* rilevato nelle medesime condizioni e nei medesimi genotipi. La reazione di sintesi del cDNA è stata condotta in presenza (+RT) o in assenza (-RT) dell’enzima trascrittasi inversa.

Per confermare tale dato, la variazione dei singoli trascritti nei mutanti *nfc101/nfc102* è stata quantificata mediante esperimenti di real-time

qRT-PCR, condotti utilizzando *primer* specifici per le sequenze ripetute dei trasposoni analizzati, con l'eccezione del trasposone *Prem2/Ji*, che, come osservato da Hale *et al.*, (2009), produce diverse tipologie di RNA antisenso, non analizzabili mediante real-time qRT-PCR, che richiede la produzione di un unico amplicone.

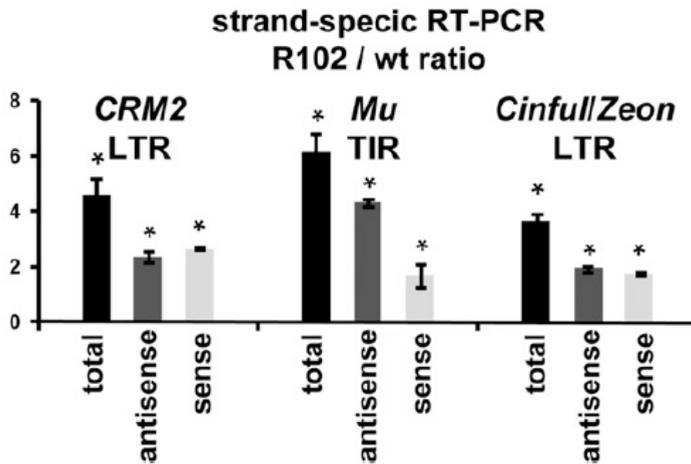


Figura 25 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti senso e antisenso prodotti rispettivamente dalle sequenze ripetute dei TE indicati. L'RNA è stato estratto dal tessuto MA di piante selvatiche e dal tessuto MA di piante mutanti R102 cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello dei singoli trascritti normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come livello di trascritto nella linea mutante rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

I dati di real-time qRT-PCR indicano che tutte e tre le sequenze analizzate mostrano, in concomitanza con la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102*, un aumento del livello di entrambe le tipologie di trascritti statisticamente superiore rispetto al controllo nel tessuto MA (Figura 25). In particolare, il livello del trascritto antisenso della sequenza TIR del trasposone a DNA *Mutator* è notevolmente incrementato nel mutante R102 rispetto al rispettivo trascritto senso (Figura 25).

In sostanza, i nostri dati suggeriscono che le sequenze LTR degli elementi *Prem2/Ji*, *Cinfull/Zeon* e *CRM2* e le sequenze TIR del trasposone *Mu* costituiscono un bersaglio delle proteine NFC101/NFC102. Abbiamo valutato, pertanto, se essi costituiscono un *target* diretto delle proteine NFC101/NFC102, mediante esperimenti di ChIP. I dati di ChIP dimostrano che le proteine NFC101/NFC102 legano direttamente tutte e quattro le sequenze ripetute dei rispettivi trasposoni analizzati *Mu*, *Prem2/Ji*, *Cinfull/Zeon* e *CRM2* sia nel tessuto MA sia nel tessuto LB (Figura 26).

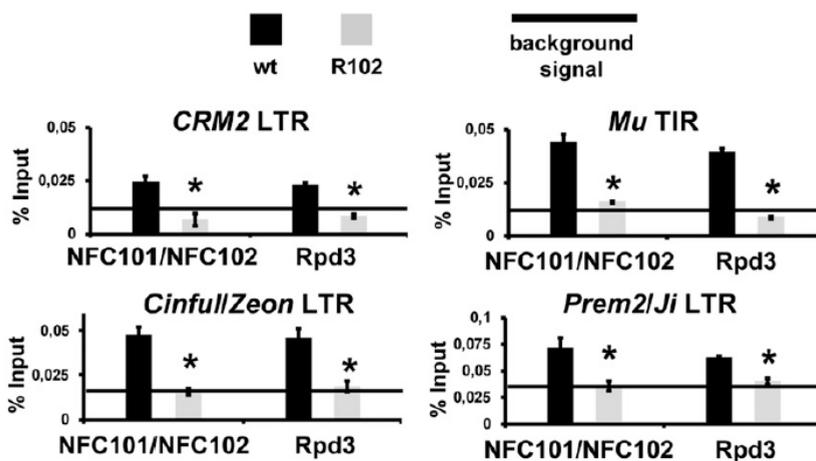


Figura 26 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato con gli anticorpi indicati nei tessuti MA di piante mutanti R102 e di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato con i rispettivi anticorpi rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

I dati di ChIP indicano anche che tale legame comporta il reclutamento della istone deacetilasi di tipo Rpd3, come suggerisce l'osservazione che la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* abolisce sostanzialmente il legame di Rpd3 alle quattro sequenze in esame (Figura 26).

Nei mutanti R102 si assiste, inoltre, ad un aumento statisticamente significativo dei marchi istonici H3ac e H3K4me2, che sono indicativi

di uno status cromatinico competente alla trascrizione (Lauria e Rossi, 2011) e, parallelamente, alla diminuzione del marchio istonico eterocromatinico H3K9me2 (Figura 27).

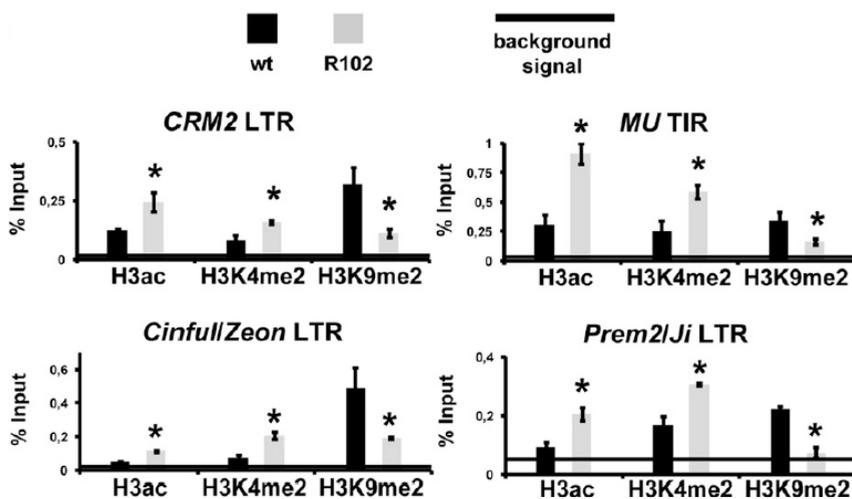


Figura 27 – Diagramma a barre che mostra la quantificazione mediante real-time qRT-PCR di DNA immunoprecipitato a livello delle regioni ripetute degli elementi *Mu*, *Prem2/Ji*, *Cinfull/Zeon* e *CRM2* nei tessuti MA di piante mutanti R102 e di piante selvatiche. La quantificazione è riportata come percentuale di DNA immunoprecipitato rispettivamente con gli anticorpi indicati rispetto al DNA totale (% Input). La linea orizzontale indica il segnale di fondo, misurato durante la procedura di ottimizzazione degli anticorpi nei saggi di ChIP. Per ogni esperimento sono stati eseguiti due saggi di ChIP indipendenti, per ognuno dei quali sono state fatte tre repliche di real-time qRT-PCR. I valori riportati sono una media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ciascuna ChIP. Le barre verticali indicano gli errori standard. Gli asterischi indicano le variazioni statisticamente significative ($P \leq 0.05$).

Riassumendo, i risultati delle nostre analisi indicano che le proteine NFC101/NFC102 reprimono la produzione sia dei trascritti senso sia dei trascritti antisenso di RNA non-poliadenilati, corrispondenti alle sequenze ripetute di trasposoni ad elevato numero di copie. Tale effetto è dovuto ad un legame diretto del complesso NFC101/NFC102-Rpd3 alle sequenze ripetute dei trasposoni, che promuove l'accumulo di modifiche istoniche tipiche di uno stato cromatinico di tipo repressivo.

Tuttavia, sebbene sia stato dimostrato che il legame di NFC101/NFC102-Rpd3 alle regioni ripetute dei trasposoni avviene sia nella foglia matura che nel tessuto MA, l'accumulo di RNA non-poliadenilati è evidente solo nel tessuto LB, suggerendo l'esistenza di un meccanismo tessuto-specifico per la regolazione della trascrizione degli elementi trasponibili mediata da NFC101/NFC102. Infine, è importante sottolineare che il livello di trascritto poliadenilato, derivante dall'attività trascrizionale della polimerasi II, che è la forma necessaria per l'attivazione dell'elemento trasponibile, è inalterato nei mutanti transgenici *nfc101/nfc102* (Figura 28).

oligo(dT)-primed cDNA
with poly(A)+ RNA

■ wt ■ R102

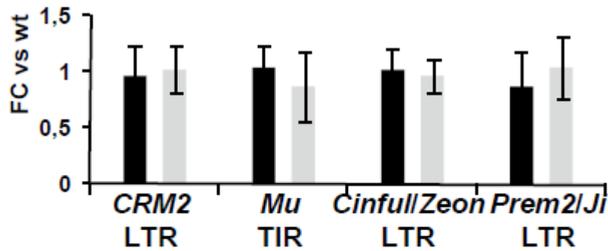


Figura 28 – Analisi della frazione di RNA poliadenilata prodotta dalle sequenze ripetute dei TE. L'RNA totale è stato estratto dal tessuto MA di piante selvatiche e di piante mutanti *nfc101/nfc102* cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Il cDNA è stato sintetizzato mediante oligo(dT) dopo la purificazione della frazione di RNA poliadenilato. Il diagramma a barre rappresenta il valore medio del livello di mRNA normalizzato sul livello dell'mRNA del gene di riferimento *gapc2* derivante da due repliche biologiche sulle quali sono state eseguite, per ciascuna, tre repliche di real-time qRT-PCR indipendenti. Le barre verticali indicano gli errori standard. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Non si osservano variazioni statisticamente significative.

Discussione

5.1. NFC101/NFC102 modulano l'espressione di regolatori della fioritura mediante modifiche della cromatina

Il *pathway* di regolazione della fioritura è solo parzialmente conservato tra *Arabidopsis* e altre piante di interesse agronomico, come *Zea mays* (Colasanti e Coneva, 2009). Per questo motivo, i precisi meccanismi di regolazione della fioritura e come essi possano essere determinati da variazioni ambientali, come il fotoperiodo, restano punti che devono essere chiariti prima di potere intervenire efficacemente per modulare la fioritura nelle piante coltivate.

Nel corso del nostro studio abbiamo fornito, per la prima volta, l'indicazione che le modifiche della cromatina svolgono un ruolo importante nel modulare l'espressione di geni chiave della fioritura in piante temperate di mais, in cui il *pathway* autonomo è il principale responsabile della regolazione della fioritura. Per fare questo abbiamo usato linee di mais transgeniche, introgredite nella linea *inbred* temperata B73, che mostrano una sotto-espressione dei geni *nfc101* e *nfc102*. Questi geni codificano per proteine WD-repeat che sono noti componenti di vari complessi multi-proteici in grado di modificare la cromatina e omologhi a FVE, regolatore chiave del *pathway* autonomo di fioritura in *Arabidopsis*. Pertanto, abbiamo alterato la funzionalità di questi epi-regolatori per vedere se e come veniva influenzata l'espressione di geni chiave della transizione tra fase vegetativa e riproduttiva.

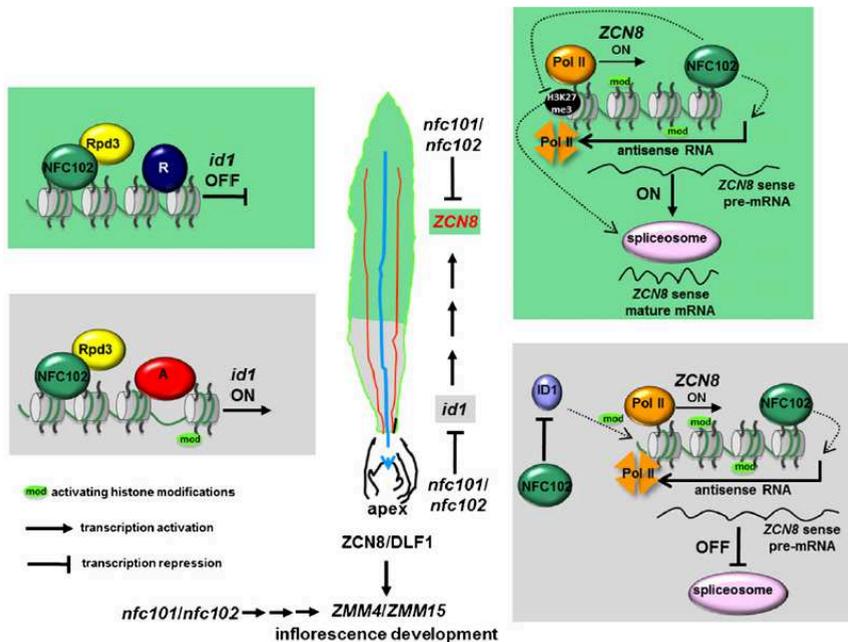


Figura 1 – Rappresentazione schematica del coinvolgimento di NFC101/NFC102 nella regolazione dei geni *ID1*, *ZCN8*, *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*.

Per semplicità solo la proteina NFC102 è indicata. Considerando l'elevata similarità di sequenza tra *nfc101* e *nfc102* (vedere Figura 1 in Informazioni supplementari), le due proteine sono intercambiabili nei complessi proteici rappresentati. Per semplicità solo la proteina ZCN8 è indicata. Se non esplicitamente indicato, la proteina ZCN7 si comporta analogamente al suo omologo ZCN8. Nell'immagine, l'area grigia rappresenta la parte immatura della foglia dove *Id1* è normalmente espresso. Questa regione è parzialmente contenuta nel tessuto denominato MA nei nostri studi, sebbene tale tessuto contenga anche il meristema apicale. L'area rappresentata in verde corrisponde alla parte fotosinteticamente attiva della foglia. Il trascritto senso maturo di *ZCN8* è specificamente espresso nel floema dei fasci vascolari della foglia (linee indicate in rosso nell'immagine). La proteina ZCN8 migra lungo il floema verso il meristema apicale (freccia indicata in blu nell'immagine), dove interagisce con DLF1 attivando i geni responsabili dello sviluppo fiorale. "R" indica uno o più fattori ignoti coinvolti nella repressione di *Id1* nella foglia matura. "A" rappresenta uno o più fattori attivatori, la cui attività è

controbilanciata dall'azione del complesso NFC101/NFC102-Rpd3 per mantenere, nel tessuto MA, l'espressione di *Id1* entro certi valori soglia. Le linee tratteggiate stanno ad indicare i meccanismi ipotizzati dai nostri studi, per i quali il reale funzionamento è ancora da chiarire. La struttura della cromatina e la dimensione dei fattori rappresentati in questa immagine hanno il solo scopo rappresentativo.

I nostri risultati indicano che i geni *nfc101/nfc102* regolano l'espressione dei principali geni coinvolti nella transizione fiorale in mais temperato, quali: *Id1*, *ZCN8* e *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*. Questi risultati ci permettono, quindi, di formulare un modello molecolare che integra il ruolo svolto da NFC101/NFC102 e dalle modifiche della cromatina nel *pathway* autonomo di fioritura in mais (Figura 1).

Il gene *Id1* è espresso nella parte fotosinteticamente inattiva della foglia (parzialmente riconducibile al tessuto MA utilizzato durante i nostri studi; area colorata in grigio in Figura 1), in risposta a segnali endogeni. Nel tessuto fogliare maturo (tessuto LB, area colorata in verde in Figura 1), *Id1* stimola l'espressione dei florigeni di mais *ZCN8* e *ZCN7*. Per *ZCN8* sono state dimostrate delle caratteristiche tipiche dei geni con funzioni di florigeno (Meng *et al.*, 2011), quindi, si presume che la proteina *ZCN8* migri attraverso il floema per raggiungere il meristema apicale, dove interagisce con DLF1. Il dimero che si forma promuove l'attivazione dei geni responsabili dell'identità fiorale, come *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*, la cui attività stimola l'inizio dello sviluppo dell'infiorescenza (Meng *et al.*, 2011).

I risultati dei nostri esperimenti indicano che le proteine NFC101/NFC102 legano direttamente i geni *Id1* e *ZCN8*, prevenendo l'accumulo di modifiche istoniche legate a una cromatina trascrizionalmente attiva e reprimendo, pertanto, la loro espressione.

Il legame di NFC101/NFC102 alla regione 5'-terminale del gene *Id1* coinvolge il reclutamento della istone deacetilasi di tipo Rpd3 sia nel tessuto MA che nel tessuto LB. Tuttavia, solo nel tessuto MA l'abolizione di tale legame induce la sovra-espressione di *Id1* e l'accumulo di modifiche istoniche, come H3ac e H3K4me2, che correlano con la cromatina attiva. Questa osservazione indica che l'azione di NFC101/NFC102 non è richiesta per reprimere l'espressione di *Id1* nella foglia matura. Al contrario, il legame del complesso NFC101/NFC102-Rpd3 a *Id1* nel tessuto MA svolge un ruolo importante nel reprimere l'espressione di *Id1*. Poiché *Id1* è comunque espresso nei tessuti MA di piante selvatiche, la sua sovra-espressione in mutanti *nfc101/nfc102* indica che, in questi tessuti, il complesso NFC101/NFC102-Rpd3 potrebbe avere la funzione di mantenere l'espressione di *Id1* entro certi valori soglia. In merito, in lievito è stata ampiamente dimostrata l'importanza della concentrazione dei fattori di trascrizione per una regolazione ottimale dei rispettivi geni target (Kim e O'Shea, 2008).

I nostri dati indicano inoltre che le proteine NFC101/NFC102 reprimono la trascrizione del florigeno *ZCN8*, ma non del suo omologo *ZCN7*, mediante, però, un meccanismo HDAC-indipendente. In particolare, i risultati ottenuti indicano che la repressione di *ZCN8* da parte di NFC101/NFC102 è regolata sia da un meccanismo diretto,

dovuto al legame di NFC101/NFC102 al locus *ZCN8*, sia da un meccanismo indiretto, che potrebbe essere dovuto al contributo di NFC101/NFC102 alla repressione di *Id1* nei tessuti MA. Entrambi i meccanismi sembrano operare nel tessuto MA, dove la sotto-espressione dei geni *nfc101/nfc102* correla con un aumento del trascritto senso di *ZCN8* e con l'accumulo al locus genico di *ZCN8* di modifiche istoniche, come H3ac e H3K4me2, che attivano la trascrizione. Per svolgere questa funzione, le proteine NFC101/NFC102 potrebbero reclutare degli enzimi che modificano la cromatina diversi dalle HDAC. Alternativamente, i nostri dati potrebbero essere compatibili anche se NFC101/NFC102 svolgono unicamente un'azione indiretta, correlata alla parziale repressione di *Id1*. Infatti, studi precedenti (Lazakis *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011) hanno proposto che *Id1* potrebbe favorire la formazione di un'ambiente cromatinico trascrizionalmente attivo al locus *ZCN8* già nella foglia immatura (tessuto MA), ambiente che verrebbe poi mantenuto durante lo sviluppo della foglia e che porterebbe alla produzione dell'mRNA senso processato di *ZCN8* esclusivamente nella foglia matura (tessuto LB).

I nostri esperimenti forniscono anche informazioni aggiuntive in merito al meccanismo attraverso il quale le proteine NFC101/NFC102 reprimono l'espressione di *ZCN8*. In particolare, abbiamo dimostrato che *ZCN8* è prodotto come una miscela di trascritti senso ed antisenso e che, sia nei mutanti *nfc101/nfc102* che nei mutanti *id1*, la produzione del trascritto senso correla negativamente con la produzione del trascritto antisenso. Ciò potrebbe essere causato da

un'interferenza fisica tra le polimerasi responsabili della produzione dei due trascritti (Hongay *et al.*, 2006) o da un meccanismo in cui lo stesso RNA antisenso influenza negativamente la produzione del trascritto senso (ad esempio, reclutando enzimi responsabili della modificazione della cromatina, De Lucia e Dean, 2011). Poiché le proteine NFC101/NFC102 legano l'estremità 3'-terminale del gene *ZCN8* e poiché nei mutanti *nfc101/nfc102* si assiste alla diminuzione del livello del trascritto antisenso di *ZCN8*, NFC101/NFC102 potrebbero interferire con la sintesi dell'RNA senso di *ZCN8* favorendo in qualche modo la sintesi del suo trascritto antisenso. I nostri risultati indicano, inoltre, che solo nel tessuto LB la cromatina di *ZCN8* è caratterizzata dall'accumulo della modifica istonica repressiva H3K27me3, e che tale accumulo è negativamente regolato da NFC101/NFC102. Dato che il trascritto senso processato di *ZCN8* è prodotto solo nel tessuto LB, si può supporre che esista un meccanismo foglia-specifico riguardante l'attivazione dello splicing del pre-mRNA di *ZCN8* (Danilevskaya *et al.*, 2008a). Inoltre, poiché è stato dimostrato che i marchi istonici possono costituire un segnale per alcuni componenti dello spliceosoma (Schwartz e Ast, 2010), l'accumulo foglia-specifico di H3K27me3 al locus *ZCN8* potrebbe essere legato proprio al processamento del pre-mRNA di *ZCN8*, che deve avvenire nella foglia matura. In tal senso, quindi, NFC101/NFC102 potrebbero partecipare anche alla regolazione del processamento del pre-mRNA di *ZCN8*. In merito all'accumulo del marchio istonico H3K27me3 al locus genico dei rispettivi florigeni, è interessante notare che le proteine NFC101/NFC102 di mais e la

proteina FVE di *Arabidopsis* si comportano in maniera opposta. FVE, infatti, favorisce l'accumulo di H3K27me3 alla cromatina di *FT* (Pazhouhandeh *et al.*, 2011). Appare chiaro, quindi, che NFC101/NFC102 e FVE regolano l'espressione dei florigeni mediante meccanismi differenti. Una possibile spiegazione è che il mais abbia sviluppato caratteristiche peculiari rispetto all'*Arabidopsis* nel processamento dell'RNA di *ZCN8*. Infatti, almeno finora, solo per il mais è stato riportato un livello di regolazione post-trascrizionale dei florigeni, mentre per le altre specie vegetali la regolazione sembra operare esclusivamente a livello trascrizionale.

Un'altra differenza tra NFC101/NFC102 e FVE è che FVE è direttamente coinvolta nella repressione del regolatore chiave della transizione fiorale, *FLC*. Al contrario, le proteine NFC101/NFC102 attivano, in maniera indiretta, i geni *FLC*-like *ZMM4* e *ZMM15*. La regolazione positiva di questi geni da parte di NFC101/NFC102 è un risultato alquanto curioso, poiché i geni *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* sono attivati anche da Id1/*ZCN8* (Meng *et al.*, 2011), che sono invece negativamente regolati da NFC101/NFC102. Tale osservazione implica l'esistenza di un meccanismo aggiuntivo e non ancora esplorato per la regolazione di *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*, che coinvolgerebbe NFC101/NFC102 in maniera indipendente da Id1/*ZCN8*. Nei mutanti *nfc101/nfc102*, l'effetto di questo meccanismo sembra essere dominante rispetto al meccanismo che coinvolge Id1 e *ZCN8*. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'attivazione di *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15* richiede la formazione del dimero proteico *ZCN8/DLF1* (Muszynski *et al.*,

2006). Poiché nei mutanti *nfc101/nfc102* solo l'espressione di *ZCN8* è sovra-regolata, questo potrebbe non bastare al raggiungimento di un adeguato rapporto stechiometrico tra *ZCN8* e *DLF1* per formare il dimero necessario alla sovra-espressione di *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*.

5.2. La sotto-espressione de geni *nfc101/nfc102* non correla con un ritardo di durata della transizione fiorale

Sebbene le proteine *NFC101/NFC102* svolgono un ruolo importante nella mediazione dell'espressione di regolatori chiave della transizione fiorale in mais, le analisi fenotipiche condotte mostrano come nei mutanti transgenici *nfc101/nfc102* non ci sia alcuna alterazione della durata della transizione fiorale rispetto al normale. Tale risultato può essere spiegato considerando che nei mutanti transgenici non si ha la completa abolizione dell'espressione di *nfc101/nfc102*, che potrebbe essere invece necessaria per ottenere un vero e proprio ritardo nel compimento della transizione fiorale. Inoltre, i nostri risultati mostrano che *NFC101/NFC102* agiscono simultaneamente in vari *pathway* durante lo sviluppo del mais, a volte anche producendo un effetto opposto nell'ambito dello stesso *pathway*. Questo accade, ad esempio, proprio nel *pathway* di fioritura, dove *NFC101/NFC102* reprimono l'espressione di *Id1* e di *ZCN8*, ma attivano *FLCP128/ZMM4* e *FLCP109/ZMM15*, che sono tutti attivatori della fioritura. Il risultato, dimostrato dalle analisi fenotipiche, è un effetto pleiotropico che potrebbe mascherare un debole effetto fenotipico a carico della fioritura.

Nel complesso, quindi, il nostro studio indica che NFC101/NFC102 sono coinvolti nella regolazione dell'espressione di controllori chiave della fioritura, ma che questo è solo uno degli aspetti svolti da queste proteine. Infatti, il coinvolgimento di NFC101/NFC102 nella regolazione di diversi *pathway*, come la trascrizione degli elementi trasponibili (TE), la transizione G1/S del ciclo cellulare e la riparazione del DNA, è dimostrata, oltre che in questo studio, anche in numerosi studi precedenti (Rossi *et al.*, 2003; Varotto *et al.*, 2003; Casati *et al.*, 2008; Campi *et al.*, 2012). Queste osservazioni suggeriscono che NFC101/NFC102 siano membri di numerosi complessi, coinvolti nel rimodellamento della cromatina, che operano in differenti processi biologici e il cui ruolo principale sia quello di facilitare e di stabilizzare l'interazione tra i componenti di questi complessi multi-proteici, grazie alla loro particolare struttura a barilotto β (Stirnemann *et al.*, 2010).

5.3. Meccanismi epigenetici nella regolazione dei florigeni mediata da *id1*.

Nella parte appena descritta ho illustrato i dati che ci hanno dato prova che le modifiche della cromatina svolgono un ruolo importante nella regolazione della fioritura in mais. Questi dati sono stati ottenuti perturbando l'espressione di epi-regolatori, la cui funzione era correlabile alle citate modifiche della cromatina in importanti controllori della transizione florale. Successivamente, abbiamo cercato di analizzare ancora più in dettaglio il ruolo svolto dalla regolazione epigenetica nella fioritura. Per fare questo, abbiamo cercato di

verificare l'ipotesi che sostiene che la principale funzione di Id1 nella regolazione dell'espressione dei florigeni sia quella di favorire la formazione di una struttura della cromatina trascrizionalmente attiva ai loci di *ZCN8* e *ZCN7* già nella foglia immatura, che viene successivamente mantenuta attraverso lo sviluppo della foglia, fino alla produzione, nella foglia matura, del RNA processato del florigeno (Lazakis *et al.*, 2011).

La regolazione positiva dei florigeni da parte di Id1 è dimostrata dall'osservazione che nei mutanti *idl1* si assiste ad un calo del livello del trascritto senso (processato e non-processato) e, parallelamente, ad un aumento del trascritto antisenso sia di *ZCN8* che di *ZCN7*. Sebbene *Id1* sia espresso solamente nella foglia immatura, la sua azione di attivatore nei confronti dei geni *ZCN8* e *ZCN7* è riscontrabile in entrambe le tipologie di tessuto analizzate (foglia immatura e foglia matura), facendo supporre che Id1 agisca nella formazione di un ambiente cromatinico favorevole alla trascrizione di *ZCN8* e di *ZCN7* già nella foglia immatura, dove il trascritto senso di questi geni è rilevabile, sebbene a livelli molto bassi e comunque non venga processato. Andando, tuttavia, ad analizzare la variazione di diverse modifiche istoniche ai loci genici di *ZCN8* e di *ZCN7* nei mutanti *idl1*, abbiamo osservato che, nella foglia immatura, Id1 è direttamente responsabile solo dell'iper-acetilazione dell'istone H3 e dell'inibizione dell'accumulo di H3K27me3. Tutti gli altri marchi istonici analizzati o non variano in funzione di Id1 (come H3K4me2) o rispondono solo indirettamente a Id1 (come H3K4me3 e H3K36me2), in quanto essi variano solo nella foglia matura nella

quale *Id1* non è espresso. Da quanto detto, ne deriva che nella foglia immatura la formazione, ai loci dei florigeni di una cromatina trascrizionalmente attiva e direttamente imputabile all'azione di *Id1* è sostenuta solo dalla variazione del marchio istonico H3ac e in parte di H3K27me3.

Oltre all'osservazione generale sopra riportata, i nostri risultati ci forniscono anche una serie di informazioni che permettono ulteriori riflessioni.

L'analisi delle diverse modifiche istoniche (in particolare di H3K4me2 e H3K36me2) suggerisce, infatti, che la presenza di un ambiente cromatinico favorevole alla trascrizione dei florigeni è presente già nella foglia immatura indipendentemente da *Id1*. Ciò significa, probabilmente, che *ZCN8* e *ZCN7* sono espressi già nella foglia immatura, sebbene prevalentemente come trascritto antisenso. Come detto sopra, infatti, nessuno dei marchi istonici attivatori analizzati, con l'eccezione di H3ac, sono indicativi di una cromatina "istruttiva" alla trascrizione di *ZCN8* e di *ZCN7* che si formerebbe già nella foglia immatura e che verrebbe poi mantenuta nella foglia matura dove si ha la produzione delle proteine florigeniche.

Dai nostri esperimenti abbiamo, inoltre, osservato che il marchio istonico repressivo H3K27me3 diminuisce solo nella foglia immatura dei mutanti *id1*, mentre non mostra alcuna variazione nella foglia matura. È interessante osservare che H3K27me3 caratterizza, in maniera del tutto inusuale rispetto a quanto si osserva normalmente nei geni di mais, le regioni 5'-terminali dei geni *ZCN8* e *ZCN7* nella foglia matura della pianta selvatica indipendentemente dalla

funzionalità di Id1. Poiché le modifiche istoniche possono costituire dei segnali per alcuni complessi dello spliceosoma (Schwartz e Ast, 2010), la deposizione di H3K27me3 nella foglia matura potrebbe essere legata in qualche modo allo splicing del pre-mRNA dei florigeni. Questo processo non sarebbe, tuttavia, mediato direttamente da Id1, che nella foglia matura non viene prodotto. In linea con quanto appena discusso, il ruolo di Id1 nella foglia immatura potrebbe essere invece quello di reprimere direttamente la deposizione di H3K27me3 ai loci di *ZCN8* e di *ZCN7*, dove i florigeni non devono essere prodotti.

Dai nostri dati emerge inoltre che anche l'accumulo di H3K4me3 nelle regioni geniche di *ZCN8* e di *ZCN7* è anomalo rispetto a quanto si osserva normalmente negli altri geni di mais (Wang *et al.*, 2009). Infatti, H3K4me3 si localizza generalmente a livello della regione 5'-terminale del gene, mentre in questo caso specifico, caratterizza principalmente la regione genica 3'-terminale.

La diminuzione di H3K4me3 e di H3K36me2 nella foglia matura dei mutanti *idl* costituisce un caso particolare. Tale dato può essere spiegato ipotizzando che nei mutanti *idl* viene a mancare un effetto indiretto determinato proprio dallo stesso Id1. Questo effetto, in particolare, sarebbe responsabile dell'aumento della trascrizione di *ZCN8* e di *ZCN7* nella foglia matura, comportando un deposito maggiore di varianti istoniche di tipo H3.3, notoriamente più ricche di marchi istonici tipici di una cromatina attiva, come H3K4me3 e H3K36me2. Se questo meccanismo fosse dimostrato, vorrebbe dire che non sono le modifiche istoniche H3K4me3 e H3K36me2 a

determinare variazioni nella trascrizione dei florigeni, ma al contrario, sarebbe invece la variazione della trascrizione a determinare la variazione di questi marchi.

In conclusione, i nostri dati ci permettono di affermare che in mais, diversamente da altre piante, la regolazione dei florigeni avviene non solo a livello trascrizionale, ma anche a livello post-trascrizionale. Esiste, cioè, un importante meccanismo di regolazione della produzione di un florigeno “attivo”, che non è legata alla trascrizione dei geni *ZCN8* e *ZCN7*, bensì al processamento dei loro trascritti. Non è, infatti, da escludere che le modifiche della cromatina siano capaci di influenzare anche il processamento degli RNA. Un esempio tipico di questo tipo di regolazione è il trascritto *COOLAIR* di *FLC* di *Arabidopsis*. Tuttavia, i dati a nostra disposizione non sono ancora sufficienti per comprendere quale sia il ruolo effettivamente svolto da *Id1* nei confronti di *ZCN8* e di *ZCN7*. È molto probabile, però, che altri fattori, oltre a *Id1*, siano coinvolti sia nella regolazione della trascrizione sia nel processamento dei florigeni di mais.

5.4. Coinvolgimento di NFC101/NFC102 nella regolazione trascrizionale dei TE

Un altro chiaro esempio del coinvolgimento di NFC101/NFC102 nella regolazione di diversi processi biologici (vedere paragrafi 5.1 e 5.2) deriva dall'analisi dell'espressione di diversi TE nei mutanti *nfc101/nfc102*. I nostri dati suggeriscono che, esclusivamente nel tessuto MA dei mutanti *nfc101/nfc102*, la frazione non-poliadenilata di RNA, corrispondente alle sequenze ripetute degli elementi

trasponibili di mais, subisce una sovra-espressione in concomitanza dell'abolizione del legame del complesso NFC101/NFC102-Rpd3. Inoltre, l'abolizione del legame di NFC101/NFC102 alle sequenze ripetute dei trasposoni analizzati correla con l'aumento di marchi istonici caratteristici di uno status cromatinico "competente" alla trascrizione, come H3ac e H3K4me2, e, al contrario, comporta una diminuzione statisticamente significativa del marchio eterocromatinico H3K9me2. Questi risultati, quindi, suggeriscono che, analogamente a FVE/MSI5 di *Arabidopsis* (Bäurle e Dean, 2008; Gu *et al.*, 2011), le proteine NFC101/NFC102-Rpd3 appartengono a complessi che agiscono da effettori del *pathway* RdDM responsabile della formazione di uno status cromatinico silente a livello degli elementi trasponibili.

Un aspetto interessante che emerge dai nostri risultati è che entrambi i filamenti degli RNA non-poliadenilati dei TE (senso ed antisenso) sono sovra-espressi nei mutanti *nfc101/nfc102*. Questa osservazione suggerisce che la frazione di RNA non-poliadenilato rilevata nei nostri campioni sia principalmente costituita da molecole di RNA a doppio filamento, prodotte dalla RNA polimerasi RNA-dipendente (RDR), che è un componente del *pathway* RdDM (Matzke *et al.*, 2009). Sebbene molti componenti del *pathway* RdDM di *Arabidopsis* siano conservati in mais, Hale *et al.*, (2009) ha dimostrato che la produzione di RNA poliadenilato trascritto dalla stesse sequenze ripetute da noi analizzate subisce variazione solo se viene abolita l'attività della subunità grande della polimerasi IV (Pol IV), ma non se vengono alterati altri componenti dal *pathway* RdDM. Questo rappresenta un

aspetto specifico del mais, in quanto in *Arabidopsis* tutte le mutazioni a carico dei componenti del *pathway* RdDM determinano un aumento del livello dei trascritti di molti TE. A questo proposito, gli stessi autori citati in precedenza (Hale *et al.*, 2009) suggeriscono che, in mais, il principale meccanismo responsabile della repressione trascrizionale dei trasposoni sia la competizione tra la polimerasi II e la polimerasi IV riguardo alla trascrizione dei TE, con la Pol IV che esercita un effetto dominante. Quindi, solo in assenza della Pol IV, la Pol II sarebbe in grado di produrre RNA poli-adenilato usando il DNA dei TE come substrato. I nostri risultati sembrano confermare questo modello. Infatti, lo stato cromatinico permissivo alla trascrizione, che si viene a creare nei mutanti *nfc101/nfc102*, dovrebbe essere in grado di stimolare la produzione di molecole di RNA aberrante da parte della Pol IV. Tali RNA aberranti sarebbero in seguito processati da RDR, determinando l'incremento degli RNA trascritti sia in orientamento senso che antisense, che viene rilevato dai nostri esperimenti. Tuttavia, questo non altera la produzione dei trascritti poliadenilati dei TE da parte della Pol II. Infatti, la sola alterazione del complesso NFC101/NFC102-Rpd3, similmente a quanto riscontrato con mutazioni in altri componenti del *pathway* RdDM, non sembra permettere alla Pol II di operare se si è in presenza di una Pol IV funzionale (Hale *et al.*, 2009; Hollick, 2012).

Un altro importante aspetto che emerge dai nostri risultati è che la sovra-espressione dell'RNA non-poliadenilato delle sequenze ripetute dei TE è evidente nel tessuto MA, ma non nel tessuto LB dei mutanti *nfc101/nfc102*. A questo proposito, Li *et al.*, (2010) hanno riportato

che in mais il silenziamento dell'elemento *Mu* mediato da *Mu-killer* viene ridotto durante la transizione dalla fase vegetativa alla fase riproduttiva a causa di una perdita temporanea dell'espressione di alcuni epi-regolatori che agiscono in trans nella sintesi di small-interfering RNA (siRNA) ,a loro volta correlati al silenziamento di *Mu*. Per spiegare questo fenomeno, gli stessi autori hanno suggerito che la transizione tra fase vegetativa e riproduttiva potrebbe rappresentare una fase dello sviluppo in cui il genoma di mais ha l'opportunità di "smascherare" TE potenzialmente pericolosi per il mantenimento della sua stabilità. Il risultato comporterebbe la possibilità di attivare la trascrizione dei TE, permettendo la produzione di siRNA dai trascritti dei TE nei tessuti adiacenti ai tessuti che producono le cellule germinali. Poiché è stato dimostrato che gli siRNA sono in grado di migrare da un tessuto all'altro (Dunoyer *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010), l'ipotesi presuppone che essi si possano trasferire dal tessuto vegetativo al tessuto responsabile della produzione delle cellule germinali, dove guiderebbero il silenziamento degli stessi TE che li hanno generati, mediante il *pathway* RdDM (Li *et al.*, 2010; Lisch, 2012). Qualcosa di simile potrebbe avvenire anche nel tessuto MA utilizzato nei nostri esperimenti. Infatti, il tessuto MA è stato campionato nella fase immediatamente precedente la transizione fiorale e le foglie primordiali che circondano il SAM rappresentano la componente prevalente di questo tessuto. Inoltre, è noto che la produzione degli RNA non-poliadenilati derivanti dall'azione di RDR è un pre-requisito per la formazione degli siRNA. Quindi, in accordo con l'ipotesi

suggerita da Li *et al.*, (2010), la produzione di RNA non-poliadenilati dai TE potrebbe essere maggiore e più sensibile alla mutazione *nfc101/nfc102* nel tessuto MA rispetto al tessuto LB perché, in MA, le foglie primordiali avrebbero la funzione di proteggere dall'attivazione dei TE le adiacenti cellule riproduttive.

Bibliografia

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral *pathway* integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052-1056.

Adrian J, Farrona S, Reimer JJ, Albani MC, Coupland G, Turck F (2010) Cis-regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22:1425–1440.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011) *Molecular biology of the cell*. Fifth Edition.

Amasino R (2010) Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* 61:1001-1013.

Angel A, Song J, Dean C, Howard M (2011) A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature* 476:105-108.

Ausin I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-Garcia L and Martinez-Zapater JM (2004) Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet.* 36:162-166.

Ausín I, Alonso-Blanco C and Martínez-Zapater JM (2005) Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* 49:689-705.

Baucom RS., Estill JC., Chaparro C, Upshaw N, Jogi A, Deragon JM, Westerman RP, SanMiguel FJ, Bennetzen JL (2009) Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. *PLoS Genet.* 5(11): e1000732.

Bäurle I, Dean C (2008) Differential interactions of the autonomous *pathway* RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of *Arabidopsis* targets. *PLoS ONE* 3(7):e2733.

Becker A, Theissen G (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29:464–489.

Bennetzen JL (2005) Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Curr Opin Genet. Dev.* 15:621–627.

Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3(9):e3156.

Berg DE, Howe MM (1989) *Mobile DNA*. Washington, DC. American Society for Microbiology.

Bieker JJ (2001) Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J. Biol. Chem.* 276:34355-34358.

Blackman BK, Strasburg JL, Raduski AR, Michaels SD, Rieseberg LH (2010) The role of recently derived FT paralogs in sunflower domestication. *Curr. Biol.* 20:629–635.

Bologna NG e Voinnet O (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol.* 65:473-503.

Bomblies K, Doebley JF (2006) Pleiotropic effects of the duplicate maize *FLORICAULA/LEAFY* genes *zfl1* and *zfl2* on traits under selection during maize domestication. *Genetics* 172:519-531.

Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple *pathways* in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16(Suppl.):S18–31.

Bouveret R, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L (2006) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* MSI1. *Development* 133:1693–1702.

Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Rothstein S, Coen E (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* 379:791–797.

Buckler ES, Holland JB, Bradbury PJ, Acharya CB, Brown PJ, Browne C, Ersoz E, Flint-Garcia S, Garcia A, Glaubitz JC, Goodman MM, Harjes C, Guill K, Kroon DE, Larsson S, Lepak NK, Li HH, Mitchell SE, Pressoir G, Peiffer JA, Rosas MO, Rocheford TR, Romay MC, Romero S, Salvo S, Villeda HS, da Silva HS, Sun Q, Tian F, Upadyayula N, Ware D, Yates H, Yu JM, Zhang ZW, Kresovich S, McMullen MD (2009) The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325:714-718.

Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ (1993) DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *PNAS* 90:287-291.

Campi M, D'Andrea L, Emiliani J, Casati P (2012) Participation of chromatin-remodeling proteins in the repair of ultraviolet-B damaged DNA. *Plant Physiol.* 158:981–995.

Casati P, Campi M, Chu F, Suzuki N, Maltby D, Guan S, Burlingame AL, Walbot V (2008) Histone acetylation and chromatin remodeling are required for UV-B-dependent transcriptional activation of regulated genes in maize. *The Plant Cell* 20:827–842.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of Histone H3 Lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298(5595):1039-1043.

Chailakhyan MK (1936) New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C.R. (Dokl.) Acad. Sci. U.R.S.S.* 13:79-83.

Chardon F, Hourcade D, Combes V, Charcosset A (2005) Mapping of a spontaneous mutation for early flowering time in maize highlights contrasting allelic series at two-linked QTL on chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 112:1-11.

Chinnusamy V, Zhu JK (2009) RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Sci China C Life Sci* 52:331–343.

Choi J, Hyun Y, Kang MJ, Yun HI, Yun JY, Lister C, Dean C, Amasino RM, Noh B, Noh YS, Choi YC (2009) Resetting and regulation of *FLOWERING LOCUS C* expression during *Arabidopsis* reproductive development. *The Plant J.* 57:918-931.

Chouard P (1960) Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11:191-238.

Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Bioch.* 78:273-304.

Colasanti e Coneva (2009) Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed, something new. *Plant Physiol.* 149:56–62.

Colasanti J, Muszynski MG (2008) The maize floral transition. In SC Hake, JL Bennetzen, eds, *Handbook of Maize: Its Biology*, Springer Science 1:41-55.

Colasanti J, Tremblay R, Wong AYM, Coneva V, Kozaki A, Mable BK (2006) The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *BMC Genomics* 7:1-15.

Colasanti J, Yuan Z, Sundaresan V (1998) The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell* 93:593-603.

Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, García-Lepe R, Lewis MJ Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of *gibberellin 20-oxidase* genes. *Plant J.* 17:547–556.

Coles ND, McMullen MD, Balint-Kurti PJ, Pratt RC, Holland JB (2010) Genetic control of photoperiod sensitivity in maize revealed by joint multiple population analysis. *Genetics* 184:799-U301.

Coneva V, Zhu T, Colasanti J (2007) Expression differences between normal and *indeterminate1* maize suggest downstream targets of ID1, a floral transition regulator in maize. J. Exp. Bot. 58:3679-3693.

Cortijo S, Wardenaar R, Colomé-Tatché M, Gilly A, Etcheverry M, Labadie K, Caillieux E, Hospital F, Aury J-M, Wincker P, Roudier F, Jansen RC, Colot V, Johannes F (2014) Mapping the epigenetic basis of complex traits. Science 343:1145-1148.

Danilevskaya ON, Meng X, Hou ZL, Ananiev EV, Simmons CR (2008a) A genomic and expression compendium of the expanded PEBP gene family from maize. Plant Physiol. 146:250-264.

Danilevskaya ON, Meng X, McGonigle B and Muszynski MG (2011) Beyond flowering time. Pleiotropic function of the maize flowering. Plant Signal. & Behav. 6(9):1267-1270.

Danilevskaya ON, Meng X, Selinger DA, Deschamps S, Hermon P, Vansant G, Gupta R, Ananiev EV, Muszynski MG (2008b) Involvement of the MADS-Box gene *ZMM4* in floral induction and inflorescence development in maize. Plant Physiol. 147:2054-2069.

Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F (2003) TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. Plant Physiol. 132:1849–1860.

de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G (1991) Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein β subunits. EMBO J. 10:4097–4104.

Delichère C, Veuskens J, Hernould M, Barbacar N, Mouras A, Negrutiu I, Monéger F (1999) *SIYI*, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. EMBO J. 18:4169-4179.

De Lucia F, Crevillen P, Jones AM, Greb T and Dean C (2008) A PHD-Polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. PNAS 105:16831–16836.

De Lucia F, Dean C (2011) Long non-coding RNAs and chromatin regulation. Curr. Opin. Plant Biol. 14:168–173.

Doebley JF, Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. Cell 126:1309-1321.

Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. Nature 386:485-488.

Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, Wang Y, Jay F, Alioua A, Himber C, Voinnet O (2010) An endogenous, systemic RNAi *pathway* in plants. EMBO J. 29:1699–1712.

Englesberg E, Irr J, Power J, Lee N (1965) Positive control of enzyme synthesis by gene C in the L-arabinose system. *J. Bacteriol.* 90:946–957.

Farrona S, Coupland G, Turck F (2008) The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Sem. Cell & Develop. Biol.* 19:560–573.

Faure S, Higgins J, Turner A, Laurie DA (2007) The *FLOWERING LOCUS T-like* gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics* 176:599–609.

Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91:221–230.

Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pellegrini M, Jacobsen SE (2010) Conservation and divergence of plant and animal methylation patterning. *PNAS* 107:8689–8694.

Finnegan EJ, Dennis ES (2007) Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr Biol.* 17(22):1978–83.

Fong HK, Hurley JB, Hopkins RS, Miake-Lye R, Johnson MS, Doolittle RF, Simon MI (1986) Repetitive segmental structure of the transducin β subunit: homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. PNAS 83:2162–2166.

Galinat WC, Naylor AW (1951) Relation of photoperiod to inflorescence proliferation in *Zea mays* L. Am. J. Bot. 38: 38-47.

Gaut BS, Doebley JF (1997) DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. PNAS 94:6809–6814.

Gilbert W, Muller-Hill B (1966) Isolation of the *LAC* repressor. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A 56:1891–1898.

Goodrich J, Tweedie S (2002) REMEMBRANCE OF THINGS PAST: Chromatin remodeling in plant development. Cell Dev. Biol. 18:707-746.

Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA (2003) The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. Plant Physiol. 131:1855-1867.

Gu X, Jiang D, Yang W, Jacob Y, Michaels SD and He Y (2011) *Arabidopsis* homologs of retinoblastoma-associated protein 46/48 associate with a histone deacetylase to act redundantly in chromatin silencing. PLoS Genet. 7:e1002366-.

Guo Y, McCarty JC, Jenkins JN, Saha S (2008) QTLs for node of first fruiting branch in a cross of an upland cotton, *Gossypium hirsutum L.*, cultivar with primitive accession Texas 701. *Euphytica* 163:113–122.

Hale CJ, Erhard KF Jr, Lisch D, Hollick JB (2009) Production and processing of siRNA precursor transcripts from the highly repetitive maize genome. *PLoS Genet.* 5(8):e1000598.

Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M (2007) Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3:11.

Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control *pathways* produces short-day flowering in rice. *Nature* 422:719-722.

He H, Lehming N (2003) Global effects of histone modifications. *Funct. Genom.* 2:234:243.

He Y, Michaels S, Amasino R (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302:1751–1754.

He YH (2009) Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Mol. Plant* 2:554-564.

Henderson IR, Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418-24.

Henderson IR, Dean C (2004) Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Develop.* 131(16):3829–3838.

Hennig L, Bouveret R, Grussem W (2005) MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* 15:295–302.

Hennig L, Taranto P, Walser M, Schönrock N, Grussem W (2003) *Arabidopsis* MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Develop.* 130:2555-2565.

Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331:76-79.

Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R (1993) Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72:247–260.

Hollick JB (2012) Paramutation: a trans-homolog interaction affecting heritable gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:536–543.

Hongay CF, Grisafi PL, Galitski T, Fink GR (2006) Antisense transcription controls cell fate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 127:735–745.

Huang T, Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O (2005) The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309:1694–1696.

Huang S, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM (1998) Overexpression of *20-oxidase* confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118:773–781.

Hubert B, Rosegrant M, van Boekel M, Ortiz R (2010) The future of food: scenarios for 2050. *Crop Science* 50:S33-S50.

Huijser P, Schmid M (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Develop.* 138:4117-4129.

Irish EE, Nelson TM (1991) Identification of multiple stages in the conversion of maize meristems from vegetative to floral development. *Develop.* 112:891-898.

Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress FT

orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes & Develop.* 16:2006-2020.

Jullien PE, Mosquna A, Ingouff M, Sakata T, Ohad N, Berger F (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 6(8):e194.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn, JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286:1962-1965.

Kaya H, Shibahara KI, Taoka KI, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T (2001) *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104:131–142.

Kenzior AL, Folk WR (1998) AtMSI4 and RbAp48 WD-40 repeat proteins bind metal ions. *FEBS Lett.* 440:425-429.

Kim S, Choi K, Park C, Hwang HJ, Lee I (2006) *SUPPRESSOR OF FRIGIDA4*, encoding a C2H2-Type zinc finger protein, represses flowering by transcriptional activation of *Arabidopsis FLOWERING LOCUS C*. *The Plant Cell* 18:2985-2998.

Kim HJ, Hyun Y, Park JY, Park MJ, Park MK, Kim MD, Lee MH, Moon J, Lee I, Kim J (2004) A genetic link between cold responses

and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 36:167-171.

Kim HD, O'Shea EK (2008). A quantitative model of transcription factor-activated gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1192–1198.

Klug A, Schwabe JWR (1995) Protein motifs. 5. Zinc fingers. *FASEB J*, 9:597-604.

Kwon CS, Wagner D (2007) Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet.* 23:403-412.

Köhler C, Hennig L, Bouveret R, Gheyselinck J, Grossniklaus U and Grissem W (2003) *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J.* 22:4804–4814.

Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002) Hd3a, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* 43:1096-1105.

Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S, Shimamoto K (2008) Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Develop.* 135:767–774.

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their functions. *Cell* 128:693–705.

Kozaki A, Hake S, Colasanti J (2004) The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. *Nucleic Acids Res* 32:1710–1720.

Kuleshov NN (1933) World's diversity of phenotypes of maize. *J. Agron.* 25:688-700.

Lauria M, Rossi V (2011) Epigenetic control of gene regulation in plants. *Bioch. Bioph. Acta.* 1809:369-378.

Lazakis CM, Coneva V, Colasanti J (2011) *ZCN8* encodes a potential orthologue of *Arabidopsis* FT florigen that integrates both endogenous and photoperiod flowering signals in maize. *J. Exp. Bot.* 62:4833-4842.

Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11:204–220.

Lee EA, Tollenaar M (2007) Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. *Crop Science* 47:S202-S215.

Lewin B, Krebs JE, Goldstrin ES, Kilpatrick ST (2010) Il gene X, Zanichelli Editore.

Li H, Freeling M, Lisch D (2010) Epigenetic reprogramming during vegetative phase change in maize. PNAS 107:22184–22189.

Lifschitz E, Eshed Y (2006) Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. J. Exp. Bot. 57:3405–3414.

Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP, Eshed Y (2006) The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. PNAS 103:6398–6403.

Lim MH, Kim J, Kim YS, Chung KS, Seo YH, Lee I, Kim J, Hong CB, Kim HJ, Park CM (2004) A new *Arabidopsis* gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C. The Plant Cell 16:731-740.

Lisch D (2012) Regulation of transposable elements in maize. Curr. Opin. Plant Biol. 15:511–516.

Liu F, Marquardt S, Lister C, Swiezewski S, Dean C (2010) Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis FLC* chromatin silencing. *Science* 327:94–97.

Locatelli L, Piatti P, Motto M, Rossi V (2007) Chromatin and DNA modifications in the *Opaque2*-mediated regulation of gene transcription during maize endosperm development. *The Plant Cell* 21:1410-1427.

Loyola A, Almouzni G (2004) Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code. *Trends Cell. Biol.* 14(6):279-281.

Luger K (2003) Structure and dynamic behavior of nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:127-135.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389(6648):251–260.

Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C, Dean C (1997) *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89:737–745.

Malcomber ST, Kellogg EA (2005) *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends Plant Sci* 10:427–435.

Malcomber ST, Preston JC, Reinheimer R, Kossuth J, Kellogg EA (2006) Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Adv Bot Res.* 44:426–481.

Mascheretti I, Battaglia R, Mainieri D, Altana A, Lauria M, Rossi V (2013) The WD40-repeat proteins NFC101 and NFC102 regulate different aspects of maize development through chromatin modification. *The Plant Cell* 25:404–420.

Matsubara K, Yamanouchi U, Wang ZX, Minobe Y, Izawa T, Yano M (2008) *Ehd2*, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating *Ehd1*. *Plant Physiol.* 148:1425-1435.

Matzke MA, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21:367–376.

Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated *pathways* in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6:24-35.

Mauney JR, Phillips LL (1963) Influence of daylength and night temperature on flowering of *Gossypium*. *Bot. Gaz.* 124:278–283.

McGarry RC, Ayre BG (2012) Geminivirus-mediated delivery of florigen promotes determinate growth in aerial organs and uncouples flowering from photoperiod in cotton. *PLoS ONE* 7:e36746.

McSteen P, Laudencia-Chingcuanco D, Colasanti J (2000) A floret by any other name: control of meristem identity in maize. *Trends in Plant Science* 5:61-66.

Meng X, Muszynski MG, Danilevskaya ON (2011) The *FT-like ZCN8* gene functions as a floral activator and is involved in photoperiod sensitivity in maize. *The Plant Cell* 23:942-960.

Michaels SD, Himmelblau E, Kim SY, Schomburg FM, Amasino RM (2005) Integration of flowering signals in winter annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137:149–156.

Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872–875.

Moon J, Lee H, Kim M and Lee I (2005) Analysis of flowering *pathway* integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 46:292-299.

Mouradov A, Cremer F and Coupland G (2002) Control of flowering time: interacting *pathways* as a basis for diversity. *The Plant Cell* 14(Suppl):S111-S130.

Murzina NV, Pei XY, Zhang W, Sparkes M, Vicente-Garcia J, Pratap JV, McLaughlin SH, Ben-Shahar TR, Verreault A, Luisi BF, Laue ED (2008) Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure* 16:1077–1085.

Muszynski MG, Dam T, Li B, Shirbroun DM, Hou ZL, Bruggemann E, Archibald R, Ananiev EV, Danilevskaya ON (2006) *Delayed flowering1* encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize. *Plant Physiol.* 142:1523-1536.

Neer EJ, Smith TF (2000) A groovy new structure. *PNAS* 97:960–962.

Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, Yano M, Ogihara Y (2003) Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *Plant J.* 36:82-93.

Nowak DE, Tian B, Brasier AR (2005) Two-step cross-linking method for identification of *NF- κ B* gene network by chromatin immunoprecipitation. *BioTech.* 39:715-724.

Park SJ, Kim SL, Lee S, Je BI, Piao HL, Park SH, Kim CM, Ryu CH, Xuan YH, Colasanti J, An G, Han CD (2008) Rice Indeterminate 1

(*OsId1*) is necessary for the expression of *Ehd1* (*Early heading date 1*) regardless of photoperiod. *Plant J.* 56:1018-1029.

Pasqua G, Abbate G, Forni C (2011) *Biologia cellulare e biotecnologie vegetali*, Piccin editore.

Paterson AH, Boman RK, Brown SM, Chee PW, Gannaway JR, Gingle AR, May OL, Smith CW (2004) Reducing the genetic vulnerability of cotton. *Crop Sci.* 44:1900–1901.

Pazhouhandeh M, Molinier J, Berr A and Genschik P (2011) *MSI4/FVE* interacts with *CUL4-DDB1* and a *PRC2*-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *PNAS* 108:3430–3435.

Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405:200–203.

Petersen K, Kolmos E, Folling M, Salchert K, Storgaard M, Jensen CS, Didion T, Nielsen KK (2006) Two MADS-box genes from perennial ryegrass are regulated by vernalization and involved in the floral transition. *Physiol. Plant* 126:268–278.

Phillips R, Kim T, Kaeppler S, Parentoni S, Shaver D, Stucker RE, Openshaw SJ (1992) Genetic dissection of maturity using RFLP.

Proceedings 47th Annual Corn and Sorghum Research Conference
47:135–150.

Pin PA, Benlloch R, Bonnet D, Wremerth-Weich E, Kraft T, Gielen JJ, Nilsson O (2010) An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science* 330:1397–1400.

Pryer NK, Salama NR, Schekman R, Kaiser CA (1993) Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum *in vitro*. *J. Cell Biol.* 120:865–875.

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995) The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80:847-857.

Ptashne M (1967) Isolation of the lambda phage repressor. *PNAS* 57:306–313.

Putterill J, Laurie R and Macknight R (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays.* 26:363-373.

Qian YW, Lee EY (1995) Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of Ras in yeast. *J. Biol. Chem.* 270:25507-25513.

Rossi V, Locatelli S, Lanzaova C, Boniotti MB, Varotto S, Pipal A, Goralik-Schramel M, Lusser A, Gatz C, Gutierrez C, Motto M (2003). A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant Mol. Biol.* 51:401–413.

Rossi V, Locatelli S, Varotto S, Donn G, Pirona R, Henderson DA, Hartings H, Motto M (2007) Maize histone deacetylase *hda101* is involved in plant development, gene transcription, and sequence-specific modulation of histone modification of genes and repeats. *The Plant Cell* 19:1145-1162.

Rossi V, Varotto S, Locatelli S, Lanzaova C, Lauria M, Zanotti E, Hartings H, Motto M (2001). The maize WD-repeat gene *ZmRbAp1* encodes a member of the MSI/RbAp sub-family and is differentially expressed during endosperm development. *Mol. Genet. Genomics* 265:576–584.

Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Després B, Drevensek S, Barneche F, Dèrozier S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette ML, Robin S, Caboche M, Colot V (2011) Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis*. *Trends Genet.* 25:511-517.

Ruggieri R, Tanaka K, Nakafuku M, Kaziro Y, Toh-e A, Matsumoto K (1989) MSI1, a negative regulator of the RAS-cAMP *pathway* in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS 86:8778–8782.

Russell WK, Stuber CW (1983) Effects of photoperiod and temperatures on the duration of vegetative growth in maize. Crop Sci. 23:847-850.

Salvi S, Sponza G, Morgante M, Tomes D, Niu X (2007) Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. PNAS 104:11376–81.

Salvi S, Tuberosa R, Chiapparino E, Maccaferri M, Veillet S, van Beuningen L, Isaac P, Edwards K, Phillips RL (2002) Toward positional cloning of Vgt1, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. Plant Mol. Biol. 48:601–613.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Tolga Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Lett. Nature 419:407-411.

Saze H, Kakutani T (2010) Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. Curr Opin Plant Biol. 14:81–87.

Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley M, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh C-T, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia A-P, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia J-M, Deragon J-M, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize

genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112:1115.

Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & Dev.* 18:1263-1271.

Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW and Amasino RM (2001) *FPA*, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *The Plant Cell* 13:1427-1436.

Schwartz S, Ast G (2010) Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing. *EMBO J.* 29:1629–1636.

Searle I, He YH, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino RA, Coupland G (2006) The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Develop.* 20:898-912.

Seo PJ, Ryu J, Kang SK, Park CM (2011) Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor

contributes to photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 65:418–429.

Sheldon CC, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2009) Mechanisms of gene repression by vernalization in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 59:488–498.

Sheldon CC, Hills MJ, Lister C, Dean C, Dennis ES, Peacock WJ (2008) Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *PNAS* 105:2214-2219.

Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ and Dennis ES (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *PNAS* 97:3753-3758.

Simpson GG (2004) The autonomous *pathway*: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:570-574.

Simpson GG and Dean C (2002) *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296:285-289.

Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I and Dean C (2003) FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell* 113:777-787.

Slotkin RK, Martienssen RA (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 8:272-285.

Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T (2012) FKF1 conveys crucial timing information for CONSTANS stabilization in the photoperiodic flowering. *Science* 336:1045-1049.

Stirnemann CU, Petsalaki E, Russell RB and Müller CW (2010) WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem. Sci.* 35:565–574.

Strable J, Scanlon MJ (2009) Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harbor protocols 2009.

Suganuma T, Pattenden SG, Workman JL (2008) Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes Dev.* 22:1265–1268.

Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C (2009) Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* 462:799-803.

Thiriet C, Hayes JJ (2006) Histone dynamics during transcription: exchange of H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers during pol II elongation. *Results Probl Cell Differ.* 41:77–90.

Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2003) MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. PNAS 100(22):13099-13104.

Turck F, Fornara F, Coupland G (2008) Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. Ann. Rev. Plant Biol. 59:573-594.

Vaisman N, Tsouladze A, Robzyk K, Ben-Yehuda S, Kupiec M, Kassir Y (1995) The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and mitotic spindle formation and/or maintenance. Mol. Gen. Genet. 247:123–136.

Varotto S, Locatelli S, Canova S, Pipal A, Motto M, Rossi V (2003). Expression profile and cellular localization of maize Rpd3-type histone deacetylases during plant development. Plant Physiol. 133:606–617.

Veley KM, Michaels SD (2008) Functional redundancy and new roles for genes of the autonomous floral-promotion *pathway*. Plant Physiol. 147:682-695.

Vlăduțu C, McLaughlin J, Phillips RL (1999) Fine mapping and characterization of linked quantitative trait loci involved in the transition of the maize apical meristem from vegetative to generative structures. Genetics 153:993–1007.

Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995) The structure of the G protein heterotrimer $G_i \alpha 1 \beta 1 \gamma 2$. *Cell* 83:1047–1058.

Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, Sun H, Qi Y, Liu XS, Deng XW (2009) Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and smallRNA transcriptomes in maize. *The Plant Cell* 21:1053–1069.

Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet.* 41:630–634.

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309:1056-1059.

Williams FE, Varanasi U, Trumbly RJ (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell. Biol.* 11:3307–3316.

Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100:403-408.

Wong AYM, Colasanti J (2007) Maize floral regulator protein INDETERMINATE1 is localized to developing leaves and is not altered by light or the sink/source transition. *J. Exp. Bot.* 58:403-414.

Wu CY, You CJ, Li CS, Long T, Chen GX, Byrne ME, Zhang QF (2008) *RIDI*, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *PNAS* 105:12915-12920.

Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, Komori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T, Yoshikawa N (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol. Biol.* 75:193–204.

Yamagishi, N, Yoshikawa N (2010) Expression of *FLOWERING LOCUS T* from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. *Planta* 233:561–568.

Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. (2006) The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *PNAS* 103:19581–19586.

Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. PNAS 100:6263-6268.

Yang WN, Jiang DH, Jiang JF, He YH (2010) A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in *Arabidopsis*. The Plant J. 62:663–673.

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. The Plant Cell 12:2473-2483.

Yanofsky M, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. Nature 346:35 – 39.

Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH (2005) *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 139:770–778.

Yu CW, Liu X, Luo M, Chen C, Lin X, Tian G, Lu Q, Cui Y, Wu K. (2011) HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156:173–184.

Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA (2007) Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell* 128:763-776.

Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2009) Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 10:R62.

Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR (2007) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189-1201.

Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat. Genet.* 39:61-69.

Figura 1 - Allineamento di sequenza delle proteine ZmNFC101, ZmNFC102, AtMSI5 (indicata come NFC4) e AtFVE/AtMSI5 (indicata come NFC5) mediante ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Le sequenze proteiche sono state tratte da <http://www.chromdb.org>.

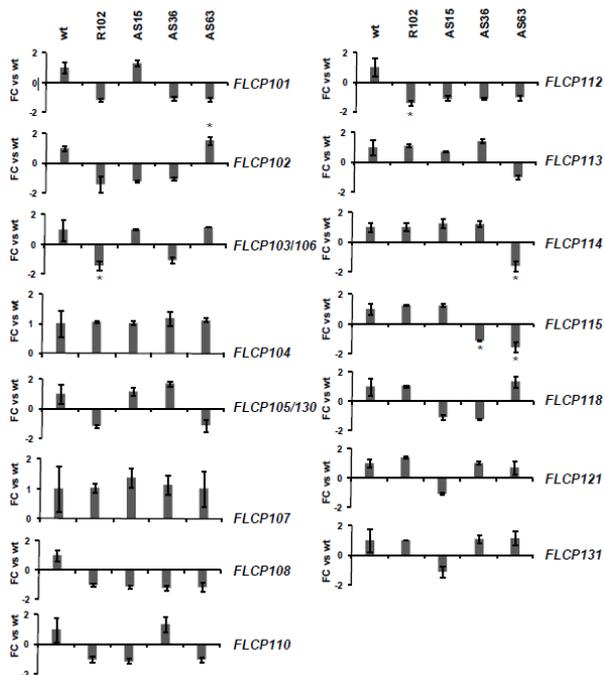


Figura 2 – Quantificazione mediante real-time qRT-PCR dei trascritti dei geni *FLCP* nel tessuto MA di piante mutanti *nfc101/nfc102* e di piante selvatiche cresciute fino allo stadio di sviluppo V3/V4. Il diagramma a barre rappresenta il livello di mRNA dei rispettivi geni normalizzato in base al livello di mRNA del gene di controllo *gapc2*. I valori riportati rappresentano il valore medio dei valori ottenuti da due repliche biologiche indipendenti, per ognuna delle quali sono state fatte 3 repliche di real-time qRT-PCR. I valori sono espressi come FC rispetto al livello di trascritto rilevato nello stesso tessuto della pianta selvatica. Le barre verticali indicano gli errori standard.

SEQUENZA DEL GENE ZCN8 (GRMZM2G179264)

>Chromosome 8: 123,030,387-123,032,175 reverse strand.

GTCCTTCCATGACGAGAACCTACCTCATCAGCATCAGCTGAAGATTCCACTTATTCATGG
TGTTAATGCACCCAACCTCACAATCAGCCTTGCAAATGCGACGTGTTTCGTTATTCCT
ACTGTGATTTATCTGTGATCCCTAGGTTTAAATGGTATAAGTCCATAGATCTTCTGTACA
GCATGTGGGTTCTCAACAAGTGGAAATACAGCTCAACGCCAGTGTATGGCGTTTACTTGG
AAGAACATGCACTGAGTATGCAGCACAAAATTTTCAGACTAGACTAGAAGAGGGAAATGTC
GAACCTGATATGCTCTTGCAAGGAAAACAAAACGTACTAAAATGCACCTCATTGTTTACA
CCACTACAGCTGGTTGCACTAAAGCTGCCAGTGGTTTACATGCTTTTATTACTCCAGCAA
ACCCAGCAATGTTAATAACTAAGTTGCTAAAGCATATATGCAACCTGAAACACCACAGA
GATCATGATTTGGCAAGAAGCACAAATTCAGCTATCTGGGTGACGTATGATGACCAATG
GTATCTCAAATGCTAGAAGTTGAATAAGACAGCCTTCTCAACTCCAGTATAAATAGTTC
ATGCTCAGACTGCAGCTTCTTCAGTCCCATAGGGAGGAAGTTGAGAGTTCTAATAAGA
CGAGTTATTTTTCTGCAATATATGTCAGCAACCGCATTTG
GTTATGGCTCGTGTGCATACAGGATGATTGGATCCCTTTACACCAACCCATCCATAAGA
ATAACGTACAACATAGGCTACTTCTGCCAAGTGTGAGCTAAAGCCATCCGCGGTTGTA
AGTAAACCACGAGTCGATATCGGTGGCAGTGACATGAGGGCTTTCTACACCTGTTAAGC
CAAGCAATTTACAGATAATGATACCATTTTGGAGAATTTATGCCAATTCATTTGGTATGT
TACACATAAAAGTATTAGCCTTTGTAATGGATTTATCAATATTAGTTTGAATGCAATTT
AATAAGAACAAAATGCCTAAATCTTGCAGTATATAAACATGTATATATGCTAACTTGTTT
GCTTTCGACTTGAAAAG**GTACTGATTGACCCGGATGCCCTAGTCCAAGCCATCCATCA**
TAAAGGAGTACTTGCTACTGTAAAAAAGCGCAATATGTTCCACTTCTAGATTTGGTTC
TTTTTCGCTTTGCCTTATATGATATTGGTCCACTATTGTTGATAG**GATGGTGACAGATATT**
CCAGAACAAC TAGTGTCAACTTTGGTAAGAATGCATATAGTTATCTGTCACTCCATTGT
GTTTCTGCTGAATATAGTATCTGTGGAGCTTAGGTTGTAGTCTCTTCTTGCTTCTCAGAC
CTATTGGCTACCATTGAACCTGATGCAGATAAGGATGCAATTAATACATGAAATCAGCAAC
CATAGGCTGAATGCTAGACCAACTGTTAGGTGAATGCAATATGGCAGCTTACCGCTTAC
ATGCATAGTAATATCATGAAATCCACTAACTTAGTACCATAACTAAAGAAGCAATCTGGT
AGAACCTCACTTTCAATCCAGCCATTACTAGAGACTGGATTATCGATATTAACACAAAC
AAGTATTTAACAGTGAATAAACTGGTATACGTATGATTCACAGTCCCCCTGTTTGTCTT
TTAATTTGGTTGGTAACCTTGAGGTGCAATTTGAGGAGTAAAGTTCCATTTACAGTTG
CCATACTAAAGTACTCAAGTACACTTTTTAGTTTTACATAGTTTTTTCATACTCGATTTT
ACCTGAGACTTTGAAACCGATATTGGAAACAAGCAGCCATTAATTTGTCAAACAAGAG
GAGCTATATTTAAAGGCTTCTCTTTGTCTAAATGAAAAGAAATAAAAACAATAAATGAGC
ACGCTCCCACTACTTCAGTGCTCCTTGAATTTACAGTATATAATGTCAGGATGCTCTC
GCAG**GCCAAGAGCTAATATTTTATGAGAGGCCGGACCCAAGATCTGGCATCCACAGCTG**
GTATTTGTGCTGTTCCGTCAACTTGGCAGGGGGACAGTTTTTGCACCAGAAATGCGCCAC
AACTTCAACTGCAGAAGCTTTGCACGGCAATATCCTCAGCATTGCCACCCTACATAT
TTCAACTGTCAAAGGAGGTTGGATCCGGCGGAAGAAGTTTAGGGAAGAGTAGAAACCA
TAGGCCACTGCATGGTCACACTATAGAAATATCATCAATAAT**GTGCACTATATTGAAATCA**
ATGCCACCCTCTATATGCTGAATGTTATGTATCTCAAACATGATTGTACTGACTTGAA
AGGTTGAGAGCTTAGTCTCTTAGCAGAATATAGCACAATATTACTAGTATGTTCCATGAT
TAATCAGACAAAGTATTTCTCCTTGGAGAAGCAAGTACAGTCTCAGGATCTTACTAGAGTA
CCTGCTTGTTTTCAACAGGTATTAACAACAACCTCAGCAGTCTGAATTTATCCAAAGTATATTT
CATGGAAAACAATCACAGCATCACATAGTGTATATTTCTTGTCTCCAAATCAGAAGAGC
ACATTTACCTTATTCACATTCAAAGTATTGTGCCAGTGTGCTTAGAAAGTAGTCAACA
AGACGCTATAAAGCATTACAAATTTTCAGAATTAACCTACAGCAGAATCACCTTGGAGAG
GAAACTAATCACTCTTCTCAAGATGGCACACCTCCACCAATTTCCATGATCTCCAAGCTT
ATATCTATGGCATCCTTCTATAAAGCACAAGCTCAGTGATATCAAACCTCTATTCCACAGA
TATCCTTGATCAGCTCATCTACTTCTTCTTGGCTCCTCATCAATTCATCATCATCATC
TGTAAGTCTCCATATAAGAGTCTGACGTGCGGCAACCAAGTGTGAGTACTAAGTAGTCA
ATAGCATGTGATTTTTCACTCAGGAACAGAAATTCAGCTGGTACACTCAC

Figura 3 - Sequenza del gene ZCN8 di *Zea mays* tratta da MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>), sulla quale sono state evidenziate le *primer combination* utilizzate per la sintesi del cDNA utilizzato per la

produzione delle sonde a RNA senso ed antisenso dei trascritti di *ZCN8/ZCN7*. In rosso è evidenziato il *primer ZCN8-6*, in giallo il *primer ZCN8-7*, utilizzati per la sintesi del cDNA per la produzione delle sonde a RNA del trascritto senso e antisenso di *ZCN8/ZCN7*. Le parti scritte in rosso ed evidenziate in rosa corrispondono agli esoni. Sono stati inoltre evidenziati i *primer* specifici per la sintesi del filamento senso e del filamento antisenso di *ZCN8*. In verde scuro è evidenziato il *primer ZCN8for* per la sintesi del trascritto antisenso di *ZCN8*. In verde chiaro è evidenziato il *primer ZCN8rev* per la sintesi del trascritto senso di *ZCN8*.

SEQUENZA DEL GENE *ZCN7* (GRMZM2G141756)

>Chromosome 6: 159,399,177-159,400,713 reverse strand.

```

CCAATATCACAGTCTGAAGCTTTGCAAAGGGGACGTGTTTTGTTATTCTACTGTAATTTA
TCTGCGATCCCTAGGTTTAAATAGTACAAGTCCCATAGATAGATCTTCTGTACAACATGT
GGGTTCTCAACAACGGGAAATACAACCTCAAGGACAGTGTATGGTGTTCAGTGGAAACCGC
GGAAGAACAACACTAAGGTATGCAGCACAATTTAGATCAGACGAAAAGAGAAAACAAG
ACAACACTACTTAGATATTTAACTAATATGCTCTTGAAGAAAAAATAAAACATACTAA
ATACACCTCGATGTTACACCACTACAGTTGACTGACTAAAGCTGCCAGTAGTTTGCCT
GCTTTGCTCCAGCAAAACCCAGCAATGTTTTAATAACTAAGTTGCTGAAGCATATCACTG
AAAAAGACTATGCAGACTGACTACACTACAGAGATCATGCTTTGACAAAGTACCTTAAA
AAATCATGCTTTGACAAAAGAGCACACTTCAGCTATCTGGGTGACGTATGACATCACAAT
GGTATCTCAAAATGCTGGAAGTTGAATAAGACAGCCTTCCTCAACTCCAGTATAAATAGTT
CATGCTCAGGCTGCAGCTTCCCTCAGTCCCATAGGGTTATTTTCTGCAGTATTTGTCAGC
AACCCTCCTTTGGTTATGGCTCGTGCCTACAGGATGTTGGATACTTTACACCAAC
CATTCACATAAGAATAACATAACAACAATAGTCAAGTTCTGGCAGGTGCTAAAGCC
ATCTGCGGTTATAAGTAAACCAGAGTCGATATCGGTGGCAATGACATGAGGACTTTCTA
CACCCCTGTGAGCCAAGCAATTTACAGATAATGCTACCCGATTGGGAGAATGTATGCCAA
TCCTTTTTATGTAGCATATAAAGTATTGTGCACCTTATAGTGGATTTATCAGCATTAGT
ATGAATAAATTTAATAAGAACAATAATGCCTTAAATCTTGCAGTATAATAAACAATGCTATA
TGCTAACATGTTTGTCTTTGACTTGAGAAGGACTGATTGACCCGGACGCCCAAGTCCA
AGCCATCCATCACTAAGGGAGTACTTGCACCTGTAAATAAAGTGCAATATGTCCCACTCT
TCCTAAATTAGGTTCTTTTTAATTTGCCTTATATGATATTGGTCACTATTGTGTAGGA
TGGTGACAGATATTCCTGAAACAACCTAGTGTCAACTTCGTATGAATGCATATAGTTATC
TGTCATTCCGTTGCGTTTCTGCTGAATACTGTGGAGCTTAGGCTGTAGTCTCTTCTTGCT
TCTCGGACTTGTGACCACCTGAATTTGGTGCAGATAATGATGCAATCAATACATGAATCA
GCAACCAATAAATGAATGCTAGACCAACTTGTAGGTGAATGCAATATCCCAGCTTAGCG
CTTACTGAAAGCCACTAAGTTAGTAGCATAACTAATAAAGCAATCAGGTGAACCTCAGTT
TCAATCTAGACCATTGCCGGAGTCTGGATATATTGGTATTAATAACAACAAGTATTTAA
TAGTGTAAATGAATAGGTATAGCTATGATTACAAGGCCATGTTTGCCTTTAATTTGGT
TGGCAACATCAGCAAAATTAGGTTTACATTTACAGTGGTCATATAAAGTTATATTCTAGTA
GTACATTTTAGTATATATAATTTTTTCATGCTTGGTTTTACCTGAGACTTTGAAACAGA
TATTGGAAACAAGGAAGCCATTAATTTGCTCAAACAAGATGAGCTATATCTAAAAGACAT
CTCTTTGTCCAAATTTGAAAGAGTTAAAAACAATAAATGTCGATGTCCCAACACTTCAG
TGTTCTTAACTCTTCAGTAGATAATGTCATGATGTTCTTGCAAGGCCAAGAGCTAGTAT
TTTATGAGAGACCAGATCCAAGATCTGGTATCCACAGGCTGGTATTTGTGTTGTTCCCGC
AACTTGGCAAGGGGTACGGTTTTTGCACCAGAAATGCGCCAAAACCTCAACTTCAAGAGCT
TTGCACGGCAATATCACCTCAGCATTTGCCAGTGTACACATTTCAACTGTCAAAGGGAAG
GTGGATCGGGTGAAGAAGGTTTAGGGAAGAGTAGAGACCATAGACCCTGCATGGCTA
GTGCACTATATTGAATGCAATGCACCACCTCTATAT

```

GCTGAATGCTATGTATCTCAAACATATGATTTGTAATGACTTGAAGGATTGAGAGCTTATT
 CTCTTAACGGAAATATAGACCAATATTTATTAGTATATATTTCCATGATTAATCAGACAAAGT
 ATTCTCCAAGGAGAAAACAGTACAGTTTCAGGGCCATACTAGTACTGCTTGTTCACAG
 GTATTAACAAACTCAGCACAACTCTGAATAATACAAAGTATATTTTCATGGAAAACAAACA
 GAGAATCACAGATTGTATATTATTCCTTACTACAATCAGAAGAGCACAACACATCATTTCC
 TTATTTCCCATTTGAAAGTATTATGCCAGTGGTACGTACCAGTTTCTTAGAAAAGTAGTCAAC
 AAGACACTACAAGCATTATAAATTCCAAGAGTTAACTTACAGCAGAATCACCATGGAGA
 GGAAACTAATAACTTCTTCTCAAGAGCCAAGATGGCACACCTCCACCAATTCCCATGACT
 CCAAGGTTTTATCTGTGGTATCTGTTCTATAGAGCGC

Figura 4 - Sequenza del gene *ZCN7* di *Zea mays* tratta da MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>), sulla quale sono state evidenziate le *primer combination* utilizzate per la sintesi del filamento senso e del filamento antisenso di *ZCN7*. In verde scuro è evidenziato il *primer ZCN7for* per la sintesi del trascritto antisenso di *ZCN8*. In verde chiaro è evidenziato il *primer ZCN7rev* per la sintesi del trascritto senso di *ZCN8*.

>ZCN8_AS

GCATATAGAGGTGGTGCATTGATTCAATATAGTGCACATTATTGATGATATTTCTATAGTGTGA**CCA**TGC
 AGTGGCCTATGGTTTCTACTCTTCCCTAAACCTTCTTCCGCCGGATCCACCTTCCCTTTGACAGTTGAAA
 TATGTAGCGGTGGCAATGCTGAGGTGATATTGCCGTGCAAAGCTTCTGCAGTTGA**AGT**TGTGGCGCATT
 CTGGTGCAAAAAGTGTCCCTCGCCAAGTTGACGGAAACAGCACAATAACCAGCCTGTGGATGCCAGATCT
 TGGGTCGGCCTCTCATAAAATAT**TAG**CTCTTGGCCTGCGAGAGCATCCTGACATTATATAC**TGAATA**GT
 TCAAGGAGCACTGAAGTATGTGGAAGCGTCTCATTATTGTTTTAA**TTT**TTTCAATTTAGACAAAGAG
 AAGCCTTAAATATAG**CTC**CTCTTGT**TGA**CAAAATTAATGGCTGCTTTGTTTCCAATATCGGTTTCAAA
 GTCTCAGGTAAATCGAGTATGAAAAAACTATG**TAA**ACTAAAAAGTGACTTGAG**TAA**CTTTAGTATGGC
 AACTGTAAATGAACCTTAGTCTGCTGAAATTGA**CAC**CTCAAGGTTACCAACCAATTAAGAACAACAG
 GGGCACTGTGAATCATACGTATACCAGTTTATTACACTGTAAATACTTGTTTGTGTTTAAATACGATAA
 TCCAGTCTCTAGTAATGGGCTGGATTGAAAGTGAGTTCTACCAGATTGCTTCTTTAGTTATGGTACTAA**C**
T**TAG**TGGATTTCATGATATTACTATGCATGTAAGCGGTAAGCTGCCATATTGCATTACCTAA**CAA**GTTG
 GTCTAGCATTACGCTATGGTTGCTGATTTTCATGTAT**TAA**TTGCATCCTTATCTGCATCAGTTCAATGGT
 AG**CCA**ATAGGTCCTGAGAAGCAAGAAGAGACTACAACC**TAA**GCTCCACAGATACTATATTCAGCAGAAACA
 CAATGGAATGACAGATAACTATATGCATTCTTACCAAAGT**TGA**CACTAG**TTG**TTTCTGGAATATCTGTCA
 CCATCTACACAATAG**TCC**ACCAATATCATAATAAGGCAAAGCGAAAAAGAACCAATCTAGGAAGTGGA
 ACATATTGGCCTTTTTTACCAGTGAAGTACTCCCTTAGTGA**TGG**ATGGCTTGGACTTGGGGCATCCGG
 GTCATCAGTACCTTTTCAAGTCGAAGCAACAAGT**TAG**CATATATACATGTTTATATACTGCAAGATT
 TAGGCATTTTGTCTTATTAATTTGTTCAAACCTAATATTGATAAATCCATTACAAGTGCA**TAA**TACTT
 TTATGTGTAACATACCAAAATGAATTGGCATAA**ATT**CTCCAAAATGGTATCATTATCTGTAAATTGCTTGG
 CTTACCAGGTTGTAG**AAA**GCCCTCATGCTACTGCCACCGATATCGACTCGTGGTTTACTTACAACCGCGG
 ATGGCTT**TAC**CTCAGCACTTGGCAGAAGTAGCCTATTGTTGTACGTTATTCTTAGTGAATGGTTGGGT**T**
AAAGGGATCCAATACATCCTGTATGACACGACCATAACCAAA**TGA**TCGGTTGCTGACATATATTGCAGA
 AAAATAACTCGCTAATGGTATTGGCCGTTGC

>ZCN7_AS

GCATATAGAGGTGGTGCATTGACATTCAATATAGTGCACATTATTGATGATAATTATATAGTGTAGCCAT
GCAGTGGTCTATGGTCTCTACTCTCCCTAAACCTTCTTCCACCCGATCCACCTTCCCTTTGACAGTTGA
AATGTGTAGCACTGGCAATGCTGAGGTGATATTTGCCGTGCAAAGCTTCTGCAGTTGAAGTITTTGGCGCAT
TTCTGGTGCAAAAACCGTACCCTGCCAAGTTGGCGGAACAACACAATACCAGCCTGTGGATACCAGAT
CTTGGATCTGGTCTCTCAATAAATACFAGCTCTTGGCCTGCAAGAACATCATGACATTATCTACFAGA
GTTTAAAGAACACTGAAGTGTGTGGGACATCGACATTTATTGTTTTTAACTCTTCAATTTGGACAAAG
AGATGTCTTTTAGATATAGCTCATCTTGTGTTGAGACAATTAATGGCTTCTTTGTTTCCAATATCTGTTTC
AAAGTCTCAGGTAAAACCAAGCATGAAAAAATTATATATACTAAAAATGTACTACTAGAAATATACTTTA
ATATGACCACTGTAATGAACCTAATTTTGTGATGTTGCCAACCAATTAAGGACAAACATGGGCCTTG
TGAATCATACGTATACCTATTTCATTTACACTATTAATACTTGTGTTGATTTAATACCAATATATCCAGA
CTCCGGCAATGGTCTAGATFGAAGCTGAGTTCTACTFGAATTGCTTTATTAGTTATGCTACTAAGTTAGTC
CTTTTCAGTAAGCGCTAAGCTGGGATATTGCATTCACCTAAAGTGTGGTCTAGCATTTCAGTTTATGGTT
GCTGATTTTCATGTATFAGATTGCATCATTATCTGCACCAATTCAGTGGTCAACAAGTCCGAGAAGCAAGAA
GAGACTACAGCCTAAGCTCCACAGTATTCAGCAGAAACGCAACGGAAFGACAGATAACTATATGCATTCA
TACCGAAGTFGACACTAGTTGTTTCAGGAATATCTGTCACCATCTCACCAATAGTGAACCAATATCATA
ATAAGGCAATTAAGAAGAACCTAATTTAGGAAAGTGGGACATATTGCACCTTTATTTACCAGTGAAGT
ACTCCCTTAGTGAATGGCTGGACTTGGGGCGTCCGGTCAATCAGTACCTTCTCAAGTCAAAGACA
AACATGTFAGCATAFAGACATGTTTTATATACTGCAAGATTTAAGGCATTTTGTCTTATTAAATTTATTC
ATACTAATGCTGATAAATCCACTATAAAGTGCACAATACTTTATATGCTACATAAAGGATTGGCATA
CATTCTCCCAATCGGGTAGCATTATCTGTAATTTGCTTGGCTCACCAGGGTGTAGAAAGTCCCTCATGTCA
TTGCCACCGATATCGACTCGTGGTTTACTTATAACCGCAGATGGCTTTCCTCAGCACCTGCCAGAACTT
GACTATTGTTGTATGTTATTCTTAGTGGAAATGGTTGGTGTAAAGGTATCCAACACATCCTGTAGGACAG
AGCCATAACCAAGGATCGGTTGCTGACATACTGCAGAAAAATAACCCATATGGGACFGAGGAAGCTGC
AGCCTGAGCATGAACATTTTACTGGAGTTGAGGAAGGCTGTCTTATTCAACTCCAGCATTTGAGATA
CCATTGTGATGCATACGTCACCCAGATAGCFGAGTGTGCTTCTTTGTCAAGCATGATTTTTTTAAC

Figura 5 - Sequenze nucleotidiche dei cDNA prodotti rispettivamente dal trascritto antisenso di *ZCN8* e di *ZCN7*. I cDNA sono stati prodotti mediante *strand specific* RT-PCR con *primer* localizzati rispettivamente nella regione 5'- terminale e 3'-terminale di *ZCN8* (*ZCN8for* e *ZCN8rev*) (indicati nella figura precedente) e di *ZCN7* (*ZCN7for* e *ZCN7rev*). Le ORF, lunghe fino a 30 codoni, sono state identificate mediante il programma *ORF finder* (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html). Esse sono state indicate sottolineando ed evidenziando il primo e l'ultimo codone in blu (*ORF per la reading frame 1*), in verde (*ORF per la reading frame 2*) e in giallo (*ORF per la reading frame 3*). La sequenza aminoacidica predetta per ciascuna *ORF* è stata analizzata mediante il programma *BLAST* utilizzando il database “*non-redundant protein sequence*” disponibile in NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con un valore e di cutoff < 0.5.

Nessuna delle ORF analizzate mostra similarità con una sequenza proteica nota, ad eccezione della *ORF1* in *reading frame 2* di *ZCN8* e della *ORF2* in *reading frame 2* di *ZCN7* (entrambe lunghe 80 aminoacidi) che mostrano rispettivamente il 32% (e value 0.008) e il 34% (e value 0.003) di identità con la sequenza aminoacidica dell'ipotetica proteina NP_001066171.1 (di 185 aminoacidi) di *Oryza sativa japonica*. Tuttavia, analizzando regioni di 10000 nucleotidi localizzate a monte e a valle dell'inizio e della fine di queste *ORF*, non sono state individuate ulteriori sequenze che mostrano omologia con la sequenza di questa proteina, suggerendo che le due *ORF* non rappresentano probabilmente l'omologo in mais della proteina NP_001066171.1 di riso.

SEQUENZA DEL GENE *Id1* (GRMZM2G011357)

>chromosome:AGPv3:1:239667269:239671792: reverse strand

GTCTGTGGAACGGAGACGGATACGGAGAGGAGAGAGAACTGTTGGCCGTGCTAAATA
 CGGATACGGAGAGGGAGTCTGCTGGAGTTGGTCTAAATACTCCAATGACACAGCTGCTCA
 GTTTGTACCACTCCACACCACATGTCGTCAATTGCATGCATGCTAGCTGCCATTGATAAAA
 AGATAGATGCAGAACTAAAGGGGGGAAAAAAGAGAGGGAGGGGCATAGCAATAGCACGT
 CTGGCTGGATGGATGGGCGTGGCTTTTTGGACCTGCAGAGGGAGTGCACCTCGATTGCAGC
 ATCTCTCTACACGTATGTTGCCCGCCTTGCCCTGGCTAGCTGCAGCAACTGCGCCTGC
 AGAGGGCAACGCCAAACCCGCTGCAGACTGCAGTGCACCTGCTGCCTCCCCCTGACGCCTT
 TTTTCCCGATCCTCTCTCGCAATAATAACAATAATAATAAATCTGATTGCCCTCCTCTCT
 CTCTCAAATAATCAGCGCTTGGACAGCAC TAGAAGCACTGAGCTAGCTGAGACCACAGAAC
 CACATGGGTCTACTATATATAAGAAGCTAGGAAGTAGAGAGGGGATCAGTAGCTAGCTAAA
 GCTTAGCCCGGGCCGGCCGAGAAGTGAAGAGAGAAGACCAAGAAACAGAGAGAGACAA
 CCGCAGGGGACAGCAGCGGGTAGCTAGCTAGCTAGCGATCGACGACAGACGATGCAGATG
 ATGATGCTCTCTGATCTCTCGTCTGACGACCAGAGGCCACTGGATCCAGCTCCTATGGC
 GGGGACATGGCCAGCTACGCCCTCAGCCCTCTTCTCGCACCGGCGGCCTCGGCCACC
 GCGCGCTGCGCCACCTCCGCGAGCCGCGCGGAGGAGCTACCAACAAGCAGGCCGCG
 GCGCGGGCAAGAGGAAGAGAAGCCAGCCGGGGAACCCAGGTACGTAGTAGTTAATTGGC
 TGACCAATCACGCCGACCGATGCACCTAATTAATGAATCAATGTGCTACAAATAAATTAA
 AACCAAAGACCCCGCGCGGAGGTGATCGCGCTGTCGCCCGCACGCTGGTGGCGACGA
 ACCGGTTCGTGTGCGAGATCTGCAACAAGGGGTCCAGCGGGACCAGAACCTGCAGTGC
 ACCGCCGGGGCCACAACCTCCCTCCCTGGAAGCTCCGCCAGCGCAGCAGCCTCGTCCCTG
 CGTCTGCGGGCGGCGAGGCTCCGGCGGCAGGCAGCAGCAGCAGCAGGGCGAGGCCGCGC
 CGACGCCGCCCGTAAGCGCTCTACGTCTGCCCGAGCCACGTGCGTGCACCAGCAGC
 CGGCGAGGTACGTATGCACGGTCTGCTCCTGCATATATGCGAGGGGAATGCTAGCGACAT
 AGCATAACATCTCATCGATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATC
 CATCAGAGCTCTGGGGACTTGGACTGGGATCAAGAAGCACTTCTCGCGGAAGCACGGGGA
 GAAGCGGTGGTGTGCGAGCGCTGCGGGAAAGCGCTACGCCGTGCAGTCCGACTGGAAGGC
 GCACGTCAAGGGGTGTGGCACCGCGGAGTACCGCTGCGACTGCGGCATCCTCTTCCAG
 GTACATCTCATATGATCACCCTGCATATATGCATGGACGACGTGCTTTGCTGTAATT
 GTAACCTGTATCATTTTTACTAACAAGCATGCTGGATATAATAGCCTAAATCTCTCACC
 GGACGGATCGAGAGAAAACCTAGCTAGACGGGATCGATCGTCCAGCAGGTTGCCGCCGA

CGACTGTTCCATCGATCGAGCCTGTTAATTTAGTCACAAAAAGGATCGAGCATATGCATG
TATATGAACACTATCTTCTTCACTGACCAACATCATATCATGCATGGACCTAGTTAATCAG
TACATAACTCTCTATATATACATAGTTTTTCAAGAACATTGGGTGATTCTGGAAGCAACCT
AAATATATATAGATACCAAAAATATATGAAGTCATCAGCACGATCTGCGAGTGAGTACGG
TCTTGAACCTCTCTGATGGTTGCAATAACTACCAACAAAAATATACTATATATTTGT
CGCCCACTAATTTATTTTTAACTAAATCGCGACTGATAAAAAAGAACCGATGGAGTACT
ATATATACAAGCGCATGTGGCTTCATTTACAATTTTAGGGTTCCATGCATCCTGTCTAT
AAAACATTTTGCATGATCACATCCCTATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATGCCCATAGTACTACTGTTGTGAAAAACCATGAGTCCCTGGTCAAACCCAGTATATGTA
CATGCAATATGTTTATTGCATGCATATTTGGGAATGAACATCCTCTGCCTGCACCAACT
TATGGCAGTCGTCATGTGGTCATCATGACACATTCCCTTCAAAAAATGGAACATATATAG
GTACAGCATATGAAGCAATTGAAGAGTACTTTAATTGTGAAATAGTACTACTGCAAGTAT
ATATGTAGTAGCACACAGTGAATAATGCAGTGCATTAGATATAGTAGTGAAGTTAAGA
GTTAGTTTCCAAATCTTTTACTAGAGAGATCATAAAAAATCTATAAAAAATTTCTAATTC
ACTTCTAATGTATCTTATGTTAAGAAAGAGATATATATAAAAAGAGTAAATCTGTCTATT
AGATACATCGTTAGCAGTAGTACCCTGAATTTAATTACGTCTACACACACAGCGCAC
ACATGCATGCATGCATCTGCATGCTTCTTTTCAGTAGTGATCACAAGGAAACTGACAAA
AGAACCTAGCTAATCATAGGACGCAGCTTTTCGTATCAAAAGTTAAACGAAACTTTACAT
GCATGGATTGCATTGAGTACTCAGCATGTGCAGTCAACACCGGCACACATATACGTAT
ATTAACATAGTACTTTATATACCAACTAATTAATAAAGTCATTGACTCCTCTGATCTATT
GTTTAGCTAATTAACCGTTTTCGTTTTGATGCATGCATGGTCTCTCTGGCGTGGTCTGCA
GGAAAGGACAGCCTGCTCAGGCACAGGGCCTTCTGCGATGCCTAGCAGAGGAGAGCGCGA
GGCTTCTTGACGACGAGCAAAACACGGCAGCACTATCACCAGCAGCAGCAGCAACA
ACAATGA **CTTCTCAACGCCAGCAATAAT** TCACGCCATTATCTCCCGTTCGCCAGCT
CTCCTCCTCTGTCTGTAGCGGGCCACAAAACCCTAATAACACCCTCTTCTCCTGC
ACCAAGAGCTGTCCCCCTTCTGTCAACCGAGGGTGACGATGCAACAACAACCTCGCCCT
ATCTTGACCTCCATATGCACGTCGACGCCAGCATCGTCACCACCACCGGTGGTCTCGGG
ACGGCACGCCGCTCAGCTTTGGCCCTCGCTCTGGACGGCTCGGTGGCCACCGCCACC
GGCGCCTCACTAGGGACTTCTCGGTGTCGATGGTGGCGGTCTGAGGTCGAGGAGCTGC
AGCTTCCACTGTGCGCCACAGCAGCCGACAGGTGCCAGCCGACCGCCAGCTGCGCCA
CCGACCTGACAAGGCAGTGCCTCGGGCGCCGGTGCAGCCGGTCAACGAGACCTGGAGCC
CCAAC'TCTAGGCCCGCTATATACTTCAAGCTGCATGAGACTTTGAGAGACGAATGAAC
GGAACACCCAACTGCATGCCTCTAGCTTGAAGAGCAACCAAACTGGAGTAGCAAGTA
TGGTGCCTACTGTTGTTAATTTACCTTAATTTATTGATCTCTGTTAGTTCTATTTTCAT
TTAGGGCAATCGGGGCTAGCTAATTAATTCGATGTGCACAACCTTTTGTGATGAATGGACCAG
AAAGTTTATCTTTTGTCTTTTTTTGTGATTATGTTTCGCTGAGAGGCATGTGTTCTCA
TAATGGTATGTCGAAAGAAATAGATGATATACTAATAATAACCATATCTTATATACTAGTC
AGTCTAAACAACATGAATAAAGATTCAATCAAGCTAGAGTAGTGACATGGTACTGATGA
TGATGCTACGGAGTCAATCGATAAGTGGTAGTGGAGGAAAAGCTTGGTGCAACTGGCGACG
AACACGACCGCTTAACCTGGATGAACACGCAACTCGTCTGGAAGTTGAGAGCAGTCA
GCAAAATAACACTTGCCAAAAACCTTATTAATCCATCCTCTATCTGTGCAAGTTAGAAA
GATGAGTGTATGGATCGAGATCTACTCTCCCTATTGGTGTGATGTCACGTAATGCTCAG
GATGAAGAGGGCTATGACGGCAGCGCAGCATTGAGAATGAAAAACTATTAATGACTA
TCTCAAGATTTTTCAAATAAAGTAGGAGCTCTCTGATAGTAGTTTTAGTGTGCTTTTTT
CAAAAAGATCGGTATATATAGGGAACCTCCTGCCTTCGTAGTATCAACTAGCAATACAA
TATTGATTGATGTGCATCATCCA

Figura 6 - Sequenza del gene *Id1* di *Zea mays* tratta da MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>), sulla quale sono state evidenziate le *primer combination* utilizzate in real-time qRT-PCR per verificare l'esistenza di un legame diretto delle proteine NFC101/NFC102 al locus genico di *IDI*. In rosso sono evidenziati i *primer forward*, in giallo i *primer reverse*. Le parti scritte in rosso ed evidenziate in rosa corrispondono agli esoni.

SEQUENZA AMINOACIDICA DEDOTTA DELLA PROTEINA ID1

```
>GRMZM2G011357:GRMZM2G011357_T01 peptide:  
GRMZM2G011357_P01 pep:KNOWN_protein_coding  
MQMMLSDLSSDDHEATGSSSYGGDMASYALSPLFLAPAASATAPLPPPPQPPAEELTNK  
QAAGGGKRKRKRSQFGNPDPGAIEVIALSPRTLVAITNRFVCEICNKGFRDQNLQLHRRGHNL  
PWKLRQRSSLVVPSSSAAAGSGGRQQQQGEAAPTPPRKRIVYVCEPTCVHHDPARALGD  
LTGIKKHFSRKHGEKRWCCEKRYAVQSDWKAHVKCGGTREYRCDGILFSRKDSLTT  
HRAFCDALAEESARLLAAAANNSTITTTSSNNNDLLNASNNITPLFLPFASSPPVVF  
AAAQNPNTLFFLHQELSPFLQPRVTMQQQSPYLDLHMVDASIVTTGGGLADGTPVSF  
GLALDGSVATVGHRRLTRDFLGVDGGGRQVEELQLPLCATAAAAAGASRTASCATDLTRQC  
LGGRLPVNETWSHNF
```

Figura 7 - Sequenza aminoacidica dedotta della proteina ID1 (<http://www.maizegdb.org/>). Gli aminoacidi indicati in rosso indicano il punto di inserzione dell'elemento *Ds2*, vicino alla giunzione tra il terzo esone e il successivo introne (Colasanti *et al.*, 1998).

Ringraziamenti

Un caro ringraziamento alla prof.ssa Serena Varotto e al dottor Vincenzo Rossi che mi hanno dato l'opportunità di svolgere questo dottorato. Ringrazio inoltre tutto lo staff del CRA-MAC di Bergamo che ha condiviso con me questa esperienza.

*Preoccuparsi per le persone e per la loro sorte
deve sempre essere l'occupazione principale
di tutti i nostri sforzi in ambito tecnico.
Non dimenticatelo mai
in mezzo a tutti i vostri diagrammi e le vostre formule.*

Albert Einstein