

# *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

## DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze e tecnologie agrarie, ambientali e alimentari

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale di afferenza: 07-D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR12

## *Acqua attivata al plasma* per gestione e difesa ecosostenibili delle colture

Presentata da: **Yuri Zambon**

Coordinatore Corso di Dottorato:

Prof. Massimiliano Petracchi

Supervisore:

Prof.ssa Assunta Bertaccini

Co-supervisore:

Dott.ssa Nicoletta Contaldo

Esame finale anno 2019



<<You may say I'm a *dreamer*,  
but I'm not the only one>>

-John Lennon-



## INDICE

Riassunto	VII
Abstract	X
INTRODUZIONE	
1. INTERAZIONE PIANTA-PATOGENO	
1.1. Concetti generali	1
1.2. Ruolo dei ROS nell'interazione pianta-patogeno	2
1.3. Ruolo dei ROS nella trasduzione del segnale	3
1.4. Ruolo dei ROS nelle modificazioni della parete cellulare	4
1.5. Ruolo dei ROS nella risposta ipersensibile (HR)	5
1.6. Ruolo dei ROS nella resistenza sistemica acquisita (SAR)	7
1.7. I metaboliti secondari nella difesa delle piante	7
1.8. Elicitori e produzione di metaboliti secondari	8
2. I microRNA	
2.1. Identificazione e biogenesi	12
2.2. microRNA nelle piante	14
2.3. Modalità d'azione dei miRNA	18
2.3.1 Taglio del trascritto	18
2.3.2 Inibizione della traduzione	19
2.4. Ruolo dei miRNA nello sviluppo	19
2.5. Regolazione delle fasi transitorie	20
2.6. Regolazione della crescita fogliare	20
2.7. Regolazione del processo riproduttivo	21
2.8. Regolazione dello sviluppo radicale	22
2.9. Regolazione della senescenza	22
2.10. Ruolo in risposta a stress abiotici	23
3. I FITOPLASMI	
3.1. Caratteristiche generali	24
3.2. Classificazione	26
3.3. Trasmissione	31
3.4. Interazione con le piante ospiti	32
3.5. Importanza economica delle fitoplasmosi	36
3.6. Giallumi della vite	37
3.7. Metodi di controllo dei giallumi della vite	40

4. IL PLASMA	
4.1. Definizione ed origini	43
4.2. Applicazioni dei plasmi atmosferici	45
4.3. Acqua attivata al plasma	46
SCOPO DELLA TESI	48

## **CAPITOLO 1: Effetti del trattamento PAW in vinche micropropagate**

1. MATERIALI E METODI	49
1.1. Acqua attivata al plasma	49
1.2. Preparazione del materiale vegetale	50
1.3. Valutazione della trascrizione dei geni di difesa	50
1.3.1. Trattamento e campionamento	50
1.3.2. Estrazione di RNA	52
1.3.3. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto	53
1.3.4. Analisi qRT-PCR	53
1.3.5. Progettazione e validazione dei "primers" utilizzati	54
1.3.6. Analisi dei dati ottenuti mediante qRT-PCR	56
2. RISULTATI	57
2.1. Verifica della presenza di fitoplasmi nei germogli utilizzati	57
2.2. Estrazione degli acidi nucleici	57
2.3. Analisi trascrizionale dei geni di difesa	57
2.3.1. Gene callosio sintasi	58
2.3.2. Gene calcione sintasi	60
2.3.3. Gene fenilalanina ammonio liasi	61
2.3.4. Gene strictosidina- $\beta$ -glucosidasi	63
2.3.5. Gene deacetilvindolina-O-acetiltransferasi	64
3. DISCUSSIONE	66

## **CAPITOLO 2: Effetti del trattamento PAW in vite in vivo**

1. MATERIALI E METODI	75
1.1. Acqua attivata al plasma	75
1.2. Materiale vegetale	76
1.3. Valutazione della trascrizione dei geni di difesa	77
1.3.1. Trattamento e campionamento	77
1.3.2. Estrazione di RNA	79
1.3.3. Analisi qRT-PCR	79
1.3.4. Analisi dei dati ottenuti mediante qRT-PCR	80

2. RISULTATI	81
2.1. Estrazione degli acidi nucleici	81
2.2. Analisi trascrizionale dei geni di difesa	81
2.2.1. Gene fenilalanina ammonio liasi	82
2.2.2. Gene calcione sintasi	83
2.2.3. Gene stilbene sintasi	85
3. DISCUSSIONE	87

**CAPITOLO 3: Analisi di espressione dei miRNA nell'interazione pianta-fitoplasma ed a seguito di trattamento con PAW in piante di *C. roseus***

1. MATERIALI E METODI	92
1.1. Acqua attivata al plasma	92
1.2. Preparazione del materiale vegetale	92
1.2.1. Trattamento e campionamento	93
1.3. Analisi dei livelli di espressione dei miRNAs	95
1.3.1. Estrazione di RNA	95
1.3.2. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto	95
1.3.3. Preparazione della libreria di miRNAs	96
1.3.3.1. Purificazione della frazione di sRNA dall'RNA estratto	96
1.3.3.2. Ancoraggio degli adattatori alla porzione 3' e 5'	97
1.3.3.3. Retrotrascrizione	98
1.3.3.4. Reazione di PCR	98
1.3.3.5. Purificazione della libreria di "small RNA"	99
1.3.4. Sequenziamento e analisi delle sequenze	100
1.3.4.1. Analisi dei possibili siti "target"	101
1.3.5. Analisi "Northern blot"	101
1.3.5.1. Preparazione sonde	102
1.3.5.2. Ibridazione molecolare	102
2. RISULTATI	103
2.1. Analisi molecolari delle piante di <i>C. roseus</i>	103
2.2. Estrazione degli acidi nucleici	103
2.3. Sequenziamento mediante Illumina Hi-seq	103
2.3.1. Analisi dei miRNAs nella prova PAW	104
2.3.1.1. Studio dei miRNAs differenzialmente espressi	104
2.3.1.2. Identificazione e classificazione dei possibili miRNA "target"	107
2.3.1.3. Analisi di ontologia genica	112
2.3.2. Analisi dei miRNAs nell'interazione pianta-fitoplasma	114
2.3.2.1. Studio dei miRNAs differenzialmente espressi	114
2.3.2.2. Identificazione e classificazione dei possibili miRNA "target"	118

2.3.2.3. Analisi di ontologia genica	124
2.4. Analisi mediante "Northern blot"	126
3. DISCUSSIONE	127
3.1. Effetto del trattamento PAW	127
3.2. Interazione pianta-fitoplasma	132

## **CAPITOLO 4: Utilizzo sperimentale di PAW in campo**

1. MATERIALI E METODI	138
1.1. Acqua attivata al plasma	138
1.2. Modalità di trattamento	138
1.3. Effetti di PAW sui giallumi della vite	140
1.3.1. Scelta degli appezzamenti	140
1.3.2. Identificazione dei fitoplasmi	141
1.3.3. Elaborazione statistica dei risultati	141
1.4. Effetto di PAW sulla produzione	142
1.4.1. Scelta degli appezzamenti	142
1.4.2. Valutazione dei parametri agronomico/produttivi	143
1.4.3. Elaborazione statistica dei risultati	144
2. RISULTATI	144
2.1. Trattamento endoterapico	144
2.2. Effetto di PAW sui giallumi della vite	144
2.3. Effetto di PAW sulla produzione	150
3. DISCUSSIONE	156
CONCLUSIONE	160
BIBLIOGRAFIA	162
APPENDICI	
Appendice 1. Estrazione degli acidi nucleici	189
Appendice 2. Analisi del gene ribosomico 16S	190
Appendice 3. Micropropagazione e substrato di crescita	191
Appendice 4. Preparazione gel denaturante di poliacrilammide 8% in TBE	191
Appendice 5. Appezzamenti selezionati per la sperimentazione di campo	192
Appendice 6. Impostazione della prova di campo	200
Appendice 7. Risultati della prova di campo	204

## RIASSUNTO

---

Il presente studio ha avuto come scopo quello di sperimentare l'effetto di acqua attivata al plasma (PAW) in ambito agronomico. In particolare, valutate le caratteristiche chimiche di suddetta soluzione, rappresentate principalmente dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONs), se ne è verificata la capacità di indurre resistenza a stress biotici ed abiotici. L'ipotesi alla base di questa sperimentazione è che le forme reattive quali  $H_2O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ , contenute in PAW in ambiente acido (pH 2,5), entrando in contatto con la pianta possano fungere da elicitatori attivando la produzione di fitoalessine ed altri composti in grado di indurre resistenza. PAW è prodotto mediante trattamento di acqua sterile deionizzata con plasma atmosferico pressurizzato ottenuto attraverso l'impiego di un generatore a barriera dielettrica. PAW è stato sperimentato nell'ottica di fornire un metodo innovativo ed ecosostenibile per il controllo delle fitoplasmosi (giallumi della vite); a questo scopo è stato saggiato in pieno campo, in viti sane e infette da fitoplasmi, ed in ambiente controllato (laboratorio-serra) in piante di vinca infette da fitoplasmi ed in vinche e viti sane. Nel primo esperimento sono state utilizzati germogli micropropagati di *Catharanthus roseus* mantenuti in collezione presso il laboratorio di Fitobatteriologia (DISTAL) dal 1992. 84 germogli clonati sani e 102 infetti con il ceppo di fitoplasma hydrangea 35 (16SrI-B) sono stati dapprima trattati per immersione in PAW,  $H_2O$  distillata e fosetyl di alluminio e successivamente campionati a 0, 7, 24, 48, 96, 120 ore post-trattamento avendo l'accortezza di porre immediatamente i campioni a  $-80^\circ C$ . I campioni fogliari sono stati sottoposti ad analisi per verificare l'attività trascrizionale dei principali geni coinvolti nei meccanismi di risposta a RONs implicati nella biosintesi di alcune fitoalessine quali fenilalanina ammonio liasi, calcone sintasi, strictosidina- $\beta$ -glucosidasi, deacetilvindolina-O-acetiltransferasi e callosio sintasi. I risultati hanno evidenziato in entrambe le tesi sottoposte a trattamento con PAW, una sovra-espressione dei geni callosio sintasi, fenilalanina ammonio liasi e strictosidina- $\beta$ -glucosidasi. Allo scopo di confermare i risultati ottenuti *in vitro*, l'effetto del trattamento con PAW è stato sperimentato su viti sane (cv. Chardonnay) *in vivo*. Lo studio di espressione genica in vite ha coinvolto la via metabolica sovra-espressa nella prova eseguita in vinca previo disegno di specifiche coppie di "primers" per l'amplificazione dei geni selezionati ossia: calcone sintasi 1, calcone sintasi 2, calcone sintasi 3, fenilalanina ammonio

liasi e stilbene sintasi. Dodici viti di due anni di età sono state suddivise in quattro tesi: i) PAW, ii) PAW2 (prodotto mediante l'impiego di un generatore e una sorgente diversa), iii) FoAl (controllo positivo), ddH<sub>2</sub>O (controllo negativo). Il trattamento è stato eseguito mediante bagno radicale nelle diverse soluzioni per 25 minuti, successivamente campioni fogliari sono stati prelevati a 16, 26, 36 ore post-trattamento ed immediatamente posti a -80°C. Per ogni tempo di analisi sono stati analizzati 3 germogli clonati per tesi. I risultati ottenuti mediante analisi qRT-PCR hanno evidenziato una sovra-espressione dei geni fenilalanina ammonio liasi, calcone sintasi 2 e stilbene sintasi nelle piante trattate con PAW rispetto a quelle trattate con PAW2, FoAl e ddH<sub>2</sub>O, confermando i risultati ottenuti nell'esperimento in *vitro* su vinca.

Allo scopo di approfondire le dinamiche di interazione PAW-pianta e pianta-fitoplasma, presso l'istituto NAIK a Gödöllő, Ungheria, sono state effettuate analisi NGS ("next generation sequencing") dei miRNAs in piante di *C. roseus*. Sono state valutate le differenze in termini di librerie di miRNAs tra piante di vinca sane trattate con PAW e H<sub>2</sub>O. Le librerie di miRNAs ottenute sono state analizzate mediante sequenziatore Illumina Hiseq ed hanno messo in luce differenze in termini di popolazioni e concentrazioni di miRNA tra le tesi in esame. Nelle piante sottoposte a trattamento con PAW, sono stati rinvenuti maggiormente espressi miR159a, miR319a, miR395a, miR399b, miR398b, miR396 e miR165a, mentre sono risultati sotto-regolati miR172a/172c, miR157a/157d-3p, miR393a, miR166d, miR8016 and miR5368. I principali miRNAs maggiormente presenti nella tesi PAW sono stati individuati come sovra-espressi a seguito di esposizione ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed hanno portato a supportare l'ipotesi che PAW induca fenomeni correlati a stress ossidativo. Sono state inoltre analizzate le librerie di miRNAs di piante di vinca sane ed infette: i) piante positive alla presenza di fitoplasmi manifestanti sintomi da scopazzi, ii) piante positive alla presenza di fitoplasmi manifestanti fillodia e iii) piante sane. I risultati hanno permesso di individuare differenze in termini di popolazioni e concentrazioni di miRNA tra i gruppi in esame evidenziando in entrambe le tesi infette la sovra-espressione di miR172c, miR156g-5p, miR166d, miR398b e miR397a e nelle piante sane miR159a, miR396a, miR168a e miR8016. I miRNAs maggiormente espressi nelle piante infette, in accordo con la bibliografia disponibile e lo studio di predizione dei loro siti "target", sono risultati coinvolti

in processi quali differenziazione cellulare, sviluppo dei fiori, morfogenesi fogliare, metabolismo secondario e risposte a fattori di stress.

Infine, con l'obiettivo di verificare un possibile impiego di PAW nella gestione dei giallumi della vite, è stata condotta una prova in pieno campo su 131 viti in 17 vigneti ubicati nell'areale di produzione del Conegliano Valdobbiadene D.O.C.G. Le viti selezionate erano state precedentemente analizzate per verificare la presenza di fitoplasmi. Il trattamento, eseguito mediante endoterapia con apposito puntale, ha previsto la somministrazione di PAW o ddH<sub>2</sub>O in tre momenti della stagione (aprile-giugno-luglio) e per due anni consecutivi; come controllo sono state utilizzate piante non trattate. Al termine di ogni annata le piante sono state sottoposte ad analisi molecolari di “nested”-PCR/RFLP per verificare la presenza di fitoplasmi. Parallelamente nell'annata 2018 è stata inoltre condotta, su 4 dei 17 vigneti sopra citati, una prova agronomica per valutare modificazioni quantitativo-qualitative a seguito dei trattamenti con PAW. Per ciascuna tesi in oggetto sono stati valutati il numero di grappoli/pianta ed il peso di 100 acini. Infine, del mosto ottenuto dai cento acini di ogni tesi sono state analizzate acidità reale, acidità totale e grado Babo allo scopo di verificare anche alcuni parametri qualitativi. I risultati hanno evidenziato una riduzione, a seguito di trattamento con PAW, del 34,3%  $\pm$  1,25 delle piante positive per fitoplasmi rispetto al 15,5%  $\pm$  3 ottenuto nella tesi di controllo trattata ddH<sub>2</sub>O. Per quanto riguarda invece la prova agronomica le piante trattate con PAW presentavano un numero di grappoli statisticamente superiore ai controlli ed anche un maggior peso a parità di numero di acini, mentre le analisi chimiche sul mosto non hanno evidenziato differenze in termini qualitativi. I risultati evidenziano la capacità di PAW di stimolare in pianta l'attivazione di vie biosintetiche coinvolte nelle risposte a stress di origine biotica ed abiotica e nella produzione di fitoalessine (alcaloidi in *C. roseus* - stilbeni in *V. vinifera*). Nella prova di campo questa attività si è evidenziata in un maggior numero di piante risanate da fitoplasmi ed in un miglioramento della “fitness” dimostrato dall'incremento della produzione.

## ABSTRACT

---

The aim of this study was to test the plasma activated water's (PAW) effect in agriculture. Based on the chemical characteristics of this solution, mainly represented by the presence of reactive oxygen and nitrogen species (RONs), the purpose was to verify PAW ability to enhance some of the resistance-induced responses in plants. The hypothesis behind this experiment was that the reactive species such as  $H_2O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  contained in the PAW acid solution (pH 2.5), once in contact with the plant tissues, can act as elicitors activating plant secondary metabolism with a production of phytoalexins and other compounds involved in biotic or abiotic stress responses. PAW is produced treating sterile distilled deionized water with atmospheric pressured plasmas by nanopulsed dielectric barrier discharge. The study was aimed to verify PAW's elicitation ability on defensive responses in plants, in grapevines in the field and in periwinkle healthy and phytoplasma infected model plants and grapevines under laboratory and greenhouse conditions.

Micropropagated phytoplasma infected periwinkle shoots, maintained in collection since 1992 at the Phytobacteriology laboratories (DISTAL), were employed. For this purpose, 102 periwinkle shoots infected by phytoplasma hydrangea 35 belonging to ribosomal subgroup 16SrI-B and 84 non-infected shoots were treated by dipping them in PAW, sterile deionized distilled water (ddH<sub>2</sub>O) and phosetyl-Al (FoAl). Leaves were then collected at 0, 7, 24, 48, 96 and 120 hours after the treatment and immediately stored at -80°C. Transcriptional analyses were carried out to verify the expression of selected genes involved in reactive oxygen species responses and in the phytoalexin pathways. The results showed over-expression of phenylalanine ammonia lyase, strictosidine-β-glucosidase and deacetylindoline-O-acetyltransferase genes in plants treated with PAW when compared with those treated with FoAl and ddH<sub>2</sub>O.

To confirm the gene overexpression registered in the micropropagated periwinkles shoots after PAW treatment, similar experiments were carried out on healthy grapevines (cv. Chardonnay) maintained under greenhouse conditions. For the gene expression analyses on grapevines, the same metabolic pathway found to be overexpressed in periwinkles shoots was investigated and specific primer pairs were then designed to amplify selected genes: phenylalanine ammonia lyase, chalcone synthase 1, chalcone synthase 2, chalcone synthase

3 and stilbene synthase. Twelve 2-years old grapevines maintained in greenhouse were divided into four thesis treated with i) PAW, ii) PAW2 (produced with a different generator and from different source), iii) FoAl (positive control) and iv) ddH<sub>2</sub>O (negative control). Treatments were carried out soaking grapevine's roots for 25 minutes in the different solutions; leaves were collected from each plant at 16, 26, and 36 hours after treatment and immediately stored at -80°C. At each time point 3 plants per thesis were analyzed. Results obtained by quantitative RT-PCR analyses showed an overexpression of phenylalanine ammonia lyase, chalcone synthase 2 and stilbene synthase genes in the plants treated with PAW when compared with the those treated with PAW2, FoAl and ddH<sub>2</sub>O. This confirms the results obtained in the micropropagated periwinkles shoots. In order to improve the knowledge about both, the plant responses to PAW treatment and the phytoplasma-plant interaction, during the period spent at NAIK in Gödöllő, Hungary, a small RNA next-generation sequencing analysis was carried out on periwinkle plants. The differences among miRNA libraries from healthy periwinkles treated with PAW in comparison with plants treated with ddH<sub>2</sub>O were evaluated. Three plants for each thesis (PAW, ddH<sub>2</sub>O) were treated by submersion for 25 minutes before RNA extraction from their leaves. Subsequently for each sample a miRNA library was prepared and analyzed with an Illumina Hiseq machine. Results showed that plants treated with PAW had an overexpression of miR159, miR319a, miR395a, miR399b, miR398b, miR396 and miR165a, while periwinkle treated with distilled water overexpressed miRNAs were miR172a/172c, miR157a/157d-3p, miR393a, miR166d, miR8016 and miR5368. The miRNAs families found overexpressed in PAW treated plants are already reported to be upregulated after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition, supporting the idea that PAW stimulates different gene target involved in the oxidative stress responses. Furthermore miRNAs libraries from infected and healthy periwinkle plants were also compared. In particular three plants for each thesis were analyzed, i) phytoplasma positive periwinkles showing witches' broom symptoms ii) phytoplasma positive periwinkles showing phyllody and iii) healthy periwinkles. The results showed differences in miRNAs reads highlighting an overexpression of miR172c, miR156g-5p, miR166d, miR398b and miR397a in both infected thesis, while in the healthy plants the main miRNAs overexpressed were miR159a, miR396a, miR168a and miR8016. The miRNAs more expressed in infected plants are involved in cell differentiation, flower development, leaf morphogenesis, secondary

metabolism and stress responses, according to the gene ontology analysis and the available literature.

Finally, in order to test PAW's efficacy under field conditions, 131 grapevine plants, located in 17 vineyards different for geographical location and variety located in the Conegliano Valdobbiadene DOCG production area, were selected. Based on molecular analyses carried out on previous years, phytoplasma positive and negative grapevine plants were selected within each vineyard. Experiments were performed by injecting, using specially adapted syringes, for two consecutive years at three different times of the season (April, June and July) 10-30 ml either of PAW or ddH<sub>2</sub>O (as control) on each selected phytoplasma-infected and phytoplasma-free plants; the remaining untreated plants were used as control. Moreover, in 2018 an agronomic test was performed on 4 out of the 17 vineyard mentioned above to evaluate the effect of PAW treatments on quantitative and qualitative production parameters. At the harvesting time the number of bunches and the weight of 100 berries per plant were measured. Real acidity, total acidity and Brix degree chemical analyses were then determined on the grape must obtained from the 100 berries collected from each thesis (PAW-ddH<sub>2</sub>O). After 2 year-treatments the molecular analyses (nested-PCR/RFLP) have shown a decrease of phytoplasma infected plants when treated with PAW ( $34\% \pm 1,25$ ) compared with the ddH<sub>2</sub>O treated ones ( $15,5\% \pm 3$ ). Moreover PAW treated plants showed both, an higher number of bunches and a higher berry weight per plant, while the chemical analyses on the grape must didn't show differences.

Overall, the results obtained show the PAW's ability to stimulate the activation of biosynthetic pathways involved in plant- stress responses resulting mainly in a increased production of phytoalexins (alkaloids in *C. roseus* - stilbenes in *V. vinifera* ). In the field test this activity was shown by a higher number of plants freed from phytoplasmas with improved fitness.

# INTRODUZIONE

---

## 1. INTERAZIONE PIANTA-PATOGENO

### 1.1. Concetti generali

Le piante possiedono due diverse modalità di difesa: a) difese passive o costitutive, ossia barriere strutturali e chimiche precostituite che hanno effetto di esclusione per la maggior parte dei patogeni; b) difese attive o inducibili, in grado di individuare cellule o molecole estranee innescando una risposta rapida di difesa. Le difese si distinguono inoltre in strutturali e chimiche. Le difese passive strutturali comprendono i tessuti e le strutture cellulari che si frappongono fisicamente al patogeno, mentre le difese attive strutturali includono tutte le neo-apposizioni di materiale di varia natura (callosio, lignina, minerali), dirette a rafforzare le barriere strutturali precostituite. Le difese chimiche passive sono caratterizzate da composti ad attività antibiotica costitutivamente prodotti e presenti (fitoanticipine, proteine di difesa) nei tessuti dell'ospite, a differenza dei composti sintetizzati *ex novo*, quali le fitoalessine, e facenti parte delle difese chimiche attive. Qualsiasi forma di difesa attiva viene stimolata solo a seguito del riconoscimento del patogeno da parte della pianta ospite; nel caso in cui tale risposta sia in grado di bloccare il patogeno, l'interazione viene definita omologa incompatibile (Hutcheson, 1998), quando invece la pianta si ammala si parla di interazione omologa compatibile.

Nodo cruciale dell'interazione pianta-patogeno è rappresentato dalla fase di riconoscimento che determinerà, nel caso avvenga tempestivamente, l'instaurarsi di un'interazione omologa incompatibile oppure al contrario, un'interazione omologa compatibile contraddistinta da una risposta ritardata nel tempo che porterà quindi all'incapacità dell'ospite nell'attuare velocemente tutto il potenziale di cui dispone (Lusso & Kuc, 1999).

Le piante possono mettere in atto 3 classi di risposte attive di difesa: primarie, secondarie e terziarie. La risposta primaria denominata HR ("hypersensitive reaction") è localizzata nelle cellule a contatto con il patogeno e si manifesta mediante necrosi localizzata dei tessuti adiacenti l'area di infezione. Le risposte secondarie avvengono nelle cellule limitrofe a quelle interessate dalle risposte primarie e sono indotte da segnali generati da queste ultime ("local acquired resistance", LAR). Le molecole segnale sono principalmente forme reattive

dell'ossigeno e dell'azoto (RONs), tali composti fungono anche da elicitori per la morte cellulare programmata. Conseguentemente all'attivazione delle prime due forme di difesa si verifica un accumulo di acido salicilico che, diffondendo nei vari organi funge da segnale di attivazione per la resistenza sistemica acquisita (“systemic acquired resistance”, SAR). Infine, in seguito ad interazioni tra pianta e batteri non patogeni colonizzatori delle radici o tra pianta e insetti fitofagi si genera una risposta assimilabile a SAR denominata resistenza sistemica indotta (“Induced Systemic Resistance”, ISR) e mediata principalmente da acido jasmonico (JA) ed etilene (ET). Le piante possono dunque attivare diverse vie di difesa in funzione al tipo di patogeno presente (Garcia *et al.*, 2006).

La produzione di acido jasmonico e di etilene viene prevalentemente stimolata da agenti necrotrofici mentre quella dell'acido salicilico da patogeni biotrofici. L'attivazione di queste diverse vie metaboliche di difesa è vincolata al riconoscimento da parte della pianta di specifici composti denominati elicitori (Hammond-Kosack *et al.*, 2000). Inizialmente il termine elicitore veniva utilizzato solamente per descrivere molecole in grado di indurre la produzione di fitoalessine ad oggi comprende tutti quei composti in grado di stimolare una qualsiasi forma di difesa in pianta (Ebel *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1996; Nüernerberger *et al.*, 1999). Nel corso degli anni sono state caratterizzate diverse classi di elicitori includendo carboidrati, polimeri (come ad esempio i chitosani, polimeri del N-acetil-glucosammina), lipidi, glicopeptidi e glicoproteine. Questi composti possono derivare sia dal patogeno (elicitori esogeni) sia dalla pianta stessa (elicitori endogeni).

## **1.2. Ruolo dei ROS nell'interazione pianta-patogeno**

La produzione di forme reattive dell'ossigeno (ROS) e prevalentemente del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) avvengono a seguito di interazione con diversi patogeni (Mellersh *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 2005). Patogeni avirulenti inducono solitamente un accumulo bifasico di ROS caratterizzato da una fase iniziale di transizione seguita da una fase di accumulo correlata all'instaurarsi della resistenza (Lamb & Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). I ROS sono implicati in diversi processi correlati all'interazione pianta-patogeno; inizialmente giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione delle risposte di difesa da parte dell'ospite, mentre durante la fase di colonizzazione del patogeno il loro ruolo rimane ancora poco chiaro. Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), probabilmente la forma reattiva più importante,

agisce da composto antimicrobico durante la risposta di difesa (Apostol *et al.*, 1989; Custer *et al.*, 2004), tuttavia, il suo effetto nell'interazione pianta-patogeno dipende prevalentemente dalla sensibilità del patogeno alle concentrazioni di ROS presenti (Levine *et al.*, 1994). La quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta a livello extracellulare è influenzata da una serie di fattori tra cui la natura dell'elicitore, la specie di pianta, l'età e lo stadio di sviluppo delle cellule vegetali (Legendre *et al.*, 1993; Malolepsza, 2005).

Prove svolte da Shetty *et al.* 2007 sul patosistema grano-*Septoria tritici* hanno evidenziato come piante suscettibili, inoculate con concentrazioni 4 mM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, appaiano più resistenti manifestando la sintomatologia 6 giorni dopo i controlli non trattati. Gli autori non sono stati in grado però di definire se il risultato ottenuto dipenda dall'effetto diretto del perossido di idrogeno sul patogeno o dalla sua azione indiretta di trasduzione del segnale per l'espressione dei geni di difesa. Ad oggi, non è comunque ancora possibile stabilire quali siano le concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessarie a generare una risposta di tipo diretto o indiretto. Tuttavia, queste forme reattive risultano tossiche anche per i tessuti vegetali e pertanto la pianta ne regola costantemente la concentrazione (Torres *et al.*, 2006).

### **1.3. Ruolo dei ROS nella trasduzione del segnale**

I ROS sono coinvolti in diversi processi quali la risposta di ipersensibilità, l'accumulo di fitoalessine e l'attivazione dei geni di difesa. Sono riconosciuti dalle piante attraverso tre meccanismi (Mittler *et al.*, 2004): i) proteine recettrici non ancora identificate, ii) fattori di trascrizione sensibili alle forme redox come NPR1 (“natriuretic peptide receptor 1”) o sensibili agli sbalzi termici come HSFs (“heat-shock transcription factors”) e iii) inibizione diretta della fosfatasi (Apel & Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2002).

La fosforilazione proteica cambia il flusso ionico all'interno della cellula vegetale e genera il cosiddetto scoppio ossidativo promuovendo la risposta ipersensibile e/o l'attivazione dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa, processi fondamentali nei momenti successivi all'infezione da parte del patogeno (Chandra *et al.*, 1996; Sasabe *et al.*, 2000). Le prime reazioni nella cellula sono rappresentate dalla modificazione della permeabilità della membrana plasmatica che genera un afflusso di Ca<sup>2+</sup> e protoni ed un efflusso di ioni K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (McDowell & Dangl, 2000). Il flusso ionico generato induce la produzione extracellulare di ROS mediante l'azione di enzimi specifici che agiscono come messaggeri secondari per la

risposta ipersensibile e l'attivazione genica (Lamb & Dixon, 1997). Il calcio si è dimostrato essere una molecola fondamentale nei meccanismi di segnalazione: variazioni dei suoi livelli di concentrazione vengono registrati dai recettori dei canali calcio i quali, mediante attivazione di guanositri-fosfato (GTP) e di reazioni di fosforilazione/defosforilazione proteica, attivano ulteriori reazioni a valle (Legendre *et al.*, 1992).

I processi di fosforilazione/defosforilazione proteica, attivati dalla presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e mediati dalla cascata delle MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) portano all'attivazione dello scoppio ossidativo (Zwerger & Hirt, 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> media la trascrizione di specifici geni probabilmente attraverso ossidazione dei residui di cisteina presenti nei fattori di trascrizione (Neill *et al.*, 2002). L'attivazione delle MAPK è una reazione comune in tutte le cellule vegetali durante la trasduzione del segnale per l'attivazione dei meccanismi di difesa (Neill *et al.*, 2002); la percezione di un segnale extracellulare attiva le MAPK che a loro volta facilitano la traslocazione del segnale nel nucleo il quale può fosforilare ed attivare diversi fattori di trascrizione modulando l'espressione genica (Apel & Hirt, 2004; Hirt, 1997; Zhou *et al.*, 2004). L'attivazione della trasduzione del segnale può generare accumulo di ROS, attivazione di geni codificanti le proteine PR, attivazione di enzimi coinvolti nella sintesi di fitoalessine, attivazione di enzimi coinvolti in risposta a stress ossidativo, processi di lignificazione ed altre risposte di difesa (Alvarez *et al.*, 1998; Apel & Hirt, 2004).

Somministrazioni di ROS a basse concentrazioni determinano nelle piante l'attivazione di diversi meccanismi detossificanti come quelli innescati dagli enzimi superossido dismutasi (SOD) e glutatione-S-transferasi che provvedono ad innescare meccanismi di difesa anche nelle cellule limitrofe (Levine *et al.*, 1994).

#### **1.4. Ruolo dei ROS nelle modificazioni della parete cellulare**

Le barriere presenti nella zona periferica della cellula vegetale rappresentano la prima linea di difesa contro i patogeni a penetrazione attiva (Schulze-Lefert, 2004). Queste forme di difesa possono, per esempio, dipendere dallo spessore e dalla natura dello strato di cera epicuticolare e della cuticola o dalla composizione e dalle proprietà fisiche della parete cellulare stessa. In aggiunta, a seguito di interazioni con i patogeni, si possono verificare deposizioni di callosio e lignina nelle zone limitrofe ai siti di penetrazione (Heitefuss, 1997). La produzione di ROS all'interno della cellula vegetale è associata alla formazione di barriere

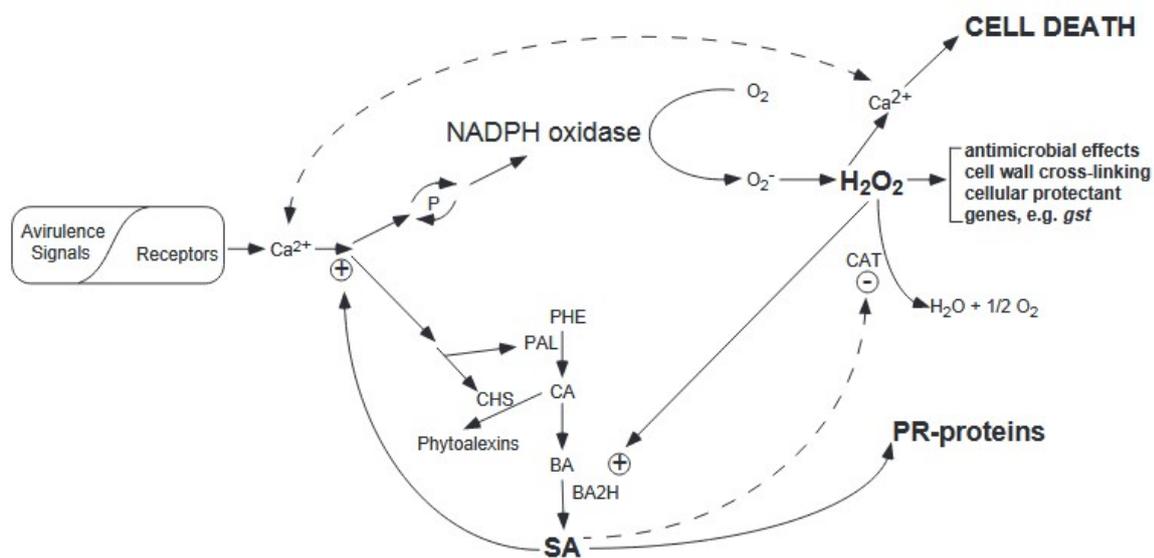
fisiche (Hückelhoven & Kogel, 2003); è stata dimostrata in diversi sistemi la correlazione tra produzione di  $H_2O_2$  e lignificazione durante tutto il ciclo di sviluppo delle piante (Olson & Varner, 1993). Il perossido di idrogeno risulta inoltre accumulato in vescicole che vengono mobilitate nelle zone di interesse ove ci sarà la deposizione di materiale (Collins *et al.*, 2003). An *et al.*, 2006 hanno dimostrato la correlazione tra accumulo di  $H_2O_2$  e movimentazione di corpi multivescicolari, vescicole ed altri composti coinvolti nell'ispessimento della parete cellulare. La deposizione di materiale a livello di parete cellulare, oltre a rappresentare una forma di difesa verso i patogeni, svolge un ruolo chiave nel contenimento della risposta ipersensibile, isolando i plasmodesmi che mettono in comunicazione le cellule sane da quelle sottoposte ad HR. Il perossido di idrogeno svolge quindi un ruolo chiave nei meccanismi di difesa attuati dalla pianta guidando le vie di segnalazione atte ad irrobustire la parete cellulare e partecipando nella risposta ipersensibile.

### **1.5. Ruolo dei ROS nella risposta ipersensibile (HR)**

La risposta ipersensibile viene innescata nella cellula vegetale a seguito di interazione con un patogeno (Lam *et al.*, 2001; Lam, 2004). Le cellule coinvolte muoiono rapidamente dopo la penetrazione coinvolgendo spesso anche alcune cellule limitrofe; tale fenomeno limita la crescita dell'agente patogeno e ne impedisce l'approvvigionamento risultando altamente efficace nelle interazioni biotrofiche (Greenberg & Yao, 2004). In aggiunta, nelle medesime cellule, vengono prodotti composti tossici quali ROS e fitoalessine atti a contrastare l'infezione (Lamb & Dixon, 1997; Li *et al.*, 2006). La risposta ipersensibile risulta invece poco efficace nei confronti dei patogeni necrotrofici i quali, uccidendo la cellula vegetale prima di nutrirsi, evitano le risposte operate dalla pianta ed anzi ne traggono vantaggio per una colonizzazione più rapida dei tessuti (Govrin & Levine, 2000).

Il coinvolgimento dei ROS nella risposta di ipersensibilità è stato dimostrato mediante l'utilizzo di composti antiossidanti o di loro inibitori (Li *et al.*, 2006) e mediante l'ausilio di specifici elicitori (Greenberg & Yao, 2004). Fondamentale per innescare la risposta di ipersensibilità è lo stress ossidativo che può essere funzionalmente definito come un eccesso di molecole perossidanti nella cellula, a seguito della riduzione dell'ossigeno  $O_2$  ad acqua. Tra queste molecole reattive, vengono annoverati l'anione o radicale superossido  $O_2^{\bullet -}$ , il perossido di idrogeno  $H_2O_2$ , i radicali idrossili  $OH^{\bullet}$  ed il radicale idroperossile  $HOO^{\bullet}$

prodotto a seguito di protonazione del radicale superossido (Farr & Kogoma, 1991). La produzione di questi intermedi reattivi o specie reattive dell'ossigeno è uno dei primi eventi della risposta di ipersensibilità (Dixon *et al*, 1994). La proprietà chimica dell'ossigeno di ridursi rende la produzione di ROS costante e spesso eccessiva e di conseguenza tutti gli organismi viventi devono continuamente intervenire per limitarne la produzione mediante l'attivazione di sistemi antiossidanti. Si ha stress ossidativo quando la concentrazione delle molecole ossidanti supera la naturale capacità della cellula di rimuoverle.



**Figura 1.** Networks di segnalazione nella risposta di ipersensibilità (da Lamb & Dixon, 1997).

Nelle piante i principali enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS sono la superossido dismutasi (SOD), che catalizza la dismutazione di  $O_2^{\bullet}$  in  $H_2O$ , la catalasi (CAT), che catalizza la trasformazione di  $H_2O_2$  in  $H_2O$  e  $O_2$  e la ascorbato perossidasi, avente la medesima funzione, con l'ascorbato quale specifico donatore di elettroni.

Questi processi ossidativi pochi minuti dopo l'infezione, provvedono all'accumulo di  $H_2O_2$  generando i primi segnali intermolecolari tra le proteine della parete cellulare. Successivamente l'aumento del contenuto di  $H_2O_2$  funge da messaggero secondario stimolando ulteriori meccanismi difensivi che, al raggiungimento di concentrazioni superiori alle soglie critiche, portano alla morte cellulare programmata quale risposta di ipersensibilità (Levine, 1999).

Sebbene il ruolo dei ROS nella HR sia stato ampiamente studiato l'intero processo metabolico risulta ancora molto complesso e di difficile interpretazione (Van Breusegem & Dat, 2006); svariate ricerche dimostrano comunque l'esistenza di una correlazione tra l'accumulo dei ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $O_2^-$ ), NO e HR (Dat *et al.*, 2003; Montillet *et al.*, 2005) evidenziando inoltre un ruolo centrale della NADPH ossidasi nella loro biosintesi (Lamb & Dixon, 1997; Li *et al.*, 2006) (Figura 1). I molteplici fattori che influenzano il ruolo dei ROS nell'attivazione di HR possono avere ruoli differenti a seconda della loro concentrazione, localizzazione e della durata del loro processo produttivo (Levine *et al.*, 1994).

### **1.6. Ruolo dei ROS nella resistenza sistemica acquisita (SAR)**

L'accumulo di specie reattive dell'ossigeno, ed in particolare di  $H_2O_2$ , oltre ad attivare la risposta di ipersensibilità gioca un ruolo chiave nell'induzione della risposta sistemica.

Elevate concentrazioni di ROS generano un meccanismo a "feedback" positivo con conseguente produzione di acido salicilico (SA) il quale, inibendo gli enzimi antiossidanti della pianta (catalasi e ascorbato perossidasi) evita la degradazione di  $H_2O_2$  facilitandone l'accumulo (Chen *et al.*, 1993). Questo processo, come visto in precedenza, aumenta i legami intermolecolari tra le proteine della parete cellulare fungendo da messaggero allo stimolo di ulteriori risposte di difesa localizzate (Bi *et al.*, 1995). Il segnale a lunga distanza, vero responsabile dell'attivazione di SAR, viene mediato dall'acido salicilico ed induce la produzione di proteine di patogenesi (PRs) (Leon *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2007), così denominate in quanto prodotte dalla pianta in maniera specifica durante lo sviluppo di SAR. Le PRs sono state raggruppate in 17 famiglie in base alla loro sequenza aminoacidica e alla loro funzione biologica (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon, 2006).

### **1.7. I metaboliti secondari nella difesa delle piante**

Le piante producono svariati composti organici, la maggior parte dei quali è coinvolta nei processi vitali di crescita e sviluppo. Possono essere divisi in due grandi categorie: i metaboliti primari, indispensabili per le piante, la cui distribuzione è ubiquitaria nel regno vegetale, rappresentati essenzialmente da zuccheri, proteine, lipidi e acidi nucleici, e i metaboliti secondari, i quali non sono coinvolti nei processi metabolici basali delle cellule ma intervengono come mediatori nelle interazioni delle piante con il loro ambiente (Verport

& Memelink, 2000). La produzione di tali composti è quasi sempre molto bassa (meno dell'1% di peso secco) e dipende dallo stadio fisiologico e di sviluppo della pianta (Oksman-Caldentey & Inzè, 2004). I metaboliti secondari sono chimicamente molto diversi e caratteristici di ogni specie vegetale. Basandosi sulla loro origine biosintetica, questi composti possono essere strutturalmente divisi in cinque grandi gruppi: polichetidi, isoprenoidi, alcaloidi, fenilpropanoidi e flavonoidi (Oksman-Caldentey & Inzè, 2004).

Il ruolo principale di molti metaboliti secondari è di difesa e di molecole segnale, questi composti infatti sono stati acquisiti in conseguenza della pressione di selezione che le piante hanno subito durante l'evoluzione (Wink, 2003). Sino ad oggi decine di migliaia di metaboliti secondari delle piante sono stati identificati ed è stato stimato che esistono centinaia di migliaia di questi composti, ancora non identificati, molti dei quali coinvolti nei meccanismi di difesa contro insetti, microorganismi, virus e piante competitive.

I principali metaboliti secondari prodotti dalle piante in risposta all'infezione da parte di un patogeno vengono definiti fitoalessine. Le prime osservazioni concernenti questo fenomeno risalgono al 1911, quando il botanico francese Noel Bernard scoprì che i tuberi di due specie di orchidee, *Orchis morio* e *Loroglossum Hircinum*, diventavano resistenti ad infezioni fungine dopo essere stati inoculati con il fungo *Rhizoctonia repens* (Grayer & Kokunun, 2000). Comportamento analogo venne riscontrato da Muller e Borger in tuberi di patata infetti con un ceppo incompatibile di *Phytophthora infestans* ottenendo resistenza nei confronti della successiva inoculazione con un ceppo compatibile dello stesso patogeno (Muller & Borger, 1940). A seguito di questi lavori si ipotizzò che, in risposta ad un'interazione incompatibile, le piante fossero in grado di produrre sostanze aspecifiche inibenti la crescita del patogeno ed atte a limitare l'infezione da parte di altri patogeni compatibili. Queste molecole vennero definite fitoalessine e sono rappresentate dai composti chimici prodotti in seguito all'invasione della cellula da parte di parassiti (Grayer & Kokubun, 2000). Nel 1963 Cruickshank riuscì ad isolare e caratterizzare da *Pisum sativum* la prima fitoalessina a cui venne dato il nome di pisatina (Cruickshank, 1963). Studi successivi evidenziarono che questi composti antimicrobici non venivano prodotti dalle piante solo in risposta ad interazioni con patogeni ma anche a seguito di stress abiotici quali radiazioni UV, trattamenti con metalli pesanti, siccità e squilibri osmotici. Nel corso degli anni sono state

identificate svariate fitoalessine chimicamente molto diverse tra loro quali fenilpropanoidi, flavonidi, isoflavonidi, sesquiterpeni e alcaloidi.

### **1.8. Elicitori e produzione di metaboliti secondari**

Gli elicitori possono essere fisici o chimici, biotici o abiotici oppure differenziati in funzione della loro origine e struttura molecolare (Radman *et al.*, 2003). Gli elicitori abiotici sono suddivisi in elicitori di origine chimica, fisica e ormonale e nella pianta determinano il manifestarsi di svariate reazioni quali la produzione di metaboliti secondari. Tra gli elicitori fisici sono importanti la luce, la salinità, lo stress osmotico, lo stress idrico e termico. Piante di *Catharanthus roseus* esposte ai raggi UV-B, ad esempio, evidenziano un significativo aumento nella produzione degli alcaloidi vinblastina e vincristina (Binder *et al.*, 2009).

I metalli pesanti rappresentano uno dei principali agenti abiotici di stress di tipo chimico per gli organismi viventi a causa della loro elevata predisposizione ad accumularsi nei terreni e alla loro tossicità (Cai *et al.*, 2013). Queste sostanze modificano il metabolismo vegetale influenzando la produzione di pigmenti fotosintetici, zuccheri ed altri composti organici (Nasim *et al.*, 2010).

Gli elicitori ormonali sono da sempre molto utilizzati nelle prove di elicitazione, con particolare attenzione all'acido jasmonico (JA) e l'acido salicilico (SA), composti chiave nell'interazione pianta-patogeno come molecole segnale. JA è generato dalla pianta in risposta ad una ferita o ad un attacco patogeno, insieme al suo derivato più attivo MeJa induce la produzione di acido rosmarinico, alcaloidi, terpeni e plumbagina in diverse culture cellulari (Krzyzanowska *et al.*, 2012; Silja *et al.*, 2014). L'acido salicilico, prevalentemente conosciuto come induttore di resistenza sistemica acquisita in risposta ad un patogeno, può elicitarne la produzione di diversi metaboliti secondari (Hayat *et al.*, 2010; Pieterse *et al.*, 1999). SA stimola la produzione di stilbene in sospensioni cellulari di *Vitis vinifera* (Xu *et al.*, 2015), di alcaloidi quali vincristina e vinblastina in *C. roseus* (Idrees *et al.*, 2010) e dell'alcaloide scopolamina in colture radicali di *Brugmansia candida* (Pitta *et al.*, 2000).

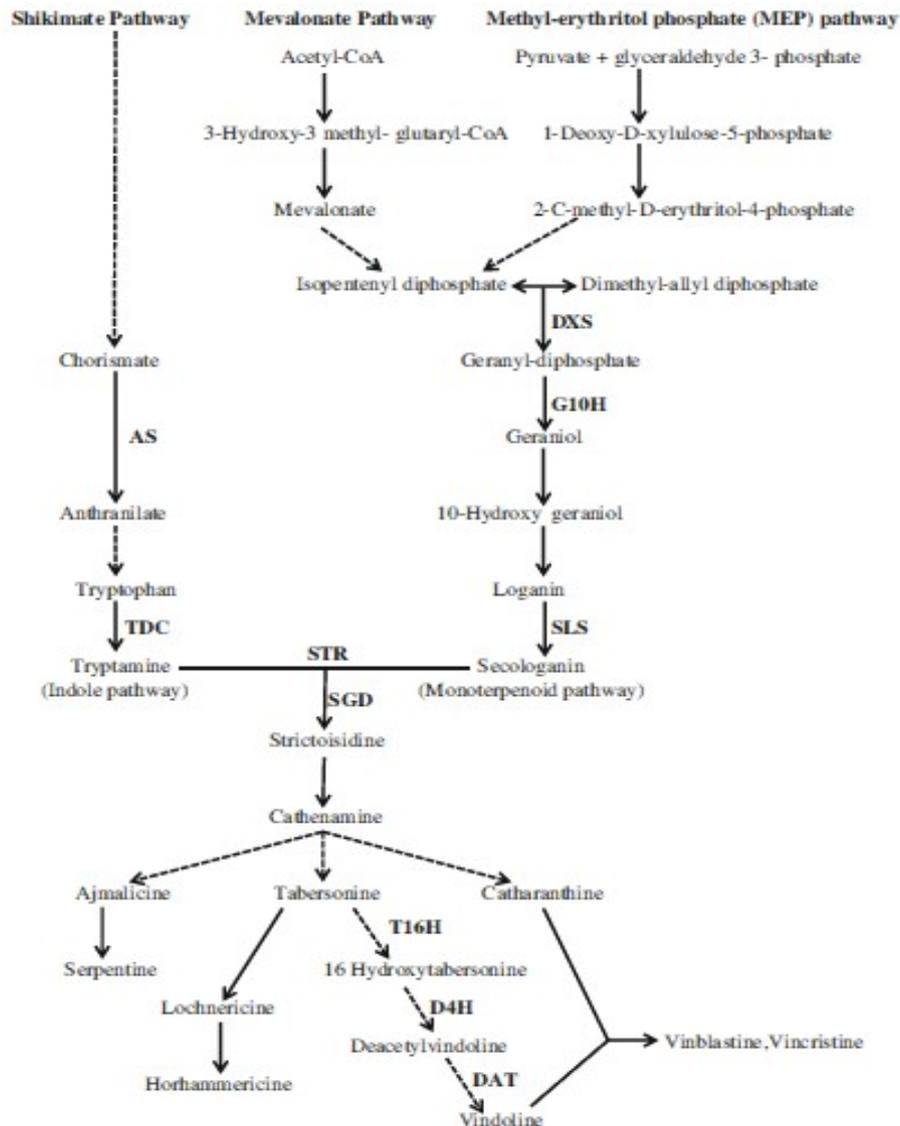
Fra gli elicitori biotici sono annoverati anche oligosaccaridi, lipidi, proteine, polichetidi che, quando presenti in bassa concentrazione (nM), causano induzione di resistenza (Shibuya & Minami, 2001).

L'applicazione di elicitori biotici di origine fungina, allo scopo di stimolare le risposte di difesa nelle piante, è una tecnica utilizzata sin dal passato quando venivano preparate miscele di estratti fungini senza però conoscerne effettivamente la composizione e le molecole realmente attive. L'utilizzo di preparati derivati da funghi patogeni e non patogeni come elicitori divenne una delle strategie più diffuse per stimolare la produzione di fenilpropanoidi e flavonoidi nelle cellule vegetali (Dixon *et al.*, 2002; Lattanzio *et al.*, 2006). Patogeni necrotrofici come ad esempio *Botrytis* sp. agiscono dapprima uccidendo le cellule ospiti, mediante secrezione di tossine, e successivamente alimentandosene (Glazebrook *et al.*, 2005). D'altro canto, patogeni biotrofici come *Fusarium* sp. e *Phoma* sp. evitano di uccidere le cellule ospiti e agiscono alterandone i processi metabolici e secrezionali (Leonard *et al.*, 2004; Boerema *et al.*, 2004).

Le cellule vegetali possiedono un complesso sistema antiossidante che interviene a loro protezione dagli effetti dannosi dei ROS (Gill & Tuteja, 2010). È dimostrato come l'enzima fenilalanina ammonio liasi (PAL) catalizzi l'ingresso della L-fenilalanina nella via metabolica dei fenilpropanoidi e svolga un ruolo determinante nella sintesi dei composti antiossidanti correlati ai meccanismi di difesa (Dixon *et al.*, 2002). Essendo questi fenomeni di resistenza indotta correlati alla produzione di svariati metaboliti secondari non sorprende il fatto che un elevato numero di elicitori risulti capace di stimolare la produzione, in piante medicinali, di importanti composti utilizzati in ambito farmaceutico. Elicitori esogeni sono rappresentati anche da componenti specifiche di virus e batteri fitopatogeni (Culver & Dawson, 1991). Uno di questi è l'arpina, un polipeptide ricco di glicina, secreto da *Erwinia amylovora*, agente del colpo di fuoco batterico delle rosacee; se infiltrata in foglie di tabacco è in grado infatti di indurre risposta di ipersensibilità, rappresentata da una rapida necrosi localizzata del tessuto vegetale.

Le numerose ricerche svolte sul fenomeno dell'elicitazione testimoniano il grande interesse della ricerca verso questo argomento; favorire la sintesi *ex novo* di importanti metaboliti secondari risulta di fondamentale importanza sia in ambito agrario, allo scopo di favorire la resistenza delle piante a diversi fattori di stress, sia in ambito medico promuovendo la produzione di sostanze farmaceutiche. Esempio concreto è rappresentato dagli alcaloidi vincristina e vinblastina presenti in *C. roseus*; questi composti, sintetizzati prevalentemente

in situazioni di stress, oltre ad aiutare la pianta risultano sostanze efficaci in campo medico nel trattamento di linfomi e leucemia (Figura 2).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica della via biosintetica degli alcaloidi in *Catharanthus roseus*; DXS: 1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato sintasi; G10H: geraniolo-10-idrossilasi; SLS: secolaganina sintasi; AS: antranilato sintasi; TDC: triptofano decarbossilasi; STR: strictosidine sintasi; SGD: strictosidine  $\beta$  glucosidasi; T16H: tabersonina 16-idrossilasi; D4H: desacetoxivindolina-4-idrossilasi; DAT: deacetelvindoline-4-O-acetiltransferasi (da Mujib *et al.*, 2012).

Quando si vuole influenzare, mediante l'utilizzo di un elicitore, la produzione dei metaboliti secondari in pianta bisogna valutare attentamente diversi parametri come ad esempio la

concentrazione e selettività del composto, la durata dell'esposizione, l'età della coltura, la composizione nutrizionale e la qualità del materiale cellulare (Ganapathi & Kangi, 1990).

La concentrazione dell'elicitore gioca un ruolo determinante nel verificarsi della trasduzione del segnale; alti dosaggi provocano, nella maggior parte dei casi, fenomeni di ipersensibilità con conseguente morte cellulare mentre livelli ottimali consentono di indurre modificazioni del metabolismo secondario (Collinge & Susarenka, 1987; Roewer *et al.*, 1992). Secondo parametro fondamentale è rappresentato dalla durata dell'esposizione della coltura o della pianta all'elicitore; elicitori diversi necessitano di archi temporali differenti per elicitare la stessa reazione (Chodiseti *et al.*, 2013).

## **2. I microRNA**

### **2.1. Identificazione e biogenesi**

L'identificazione dei microRNA (miRNA) avvenuta negli anni novanta ha dato inizio ad una nuova era in termini di comprensione dei processi regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica. I miRNA sono un'ampia classe di piccoli RNA non codificanti formati da 19-25 nucleotidi che operano regolando negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inducendo la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA) o impedendone la traduzione in proteina. Nelle piante, negli animali e nei lieviti i miRNA sono in grado di indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina (Noma *et al.*, 2004).

Le prime osservazioni sull'esistenza e sul ruolo dei miRNA nella regolazione traduzionale furono effettuate nel nematode *Caenorhabditis elegans* ove vennero identificati piccoli RNA in grado di ridurre la sintesi proteica senza modificare i livelli di accumulo di specifici mRNA. Il primo gene decritto codificante uno di questi piccoli RNA, *lin-4*, è un regolatore essenziale della divisione cellulare durante lo stadio larvale. Esso origina un corto RNA di 22 nucleotidi perfettamente complementare ad un tratto della regione 3' non tradotta (3'-UTR) dell'mRNA codificante la proteina LIN-14 controllata dal gene *lin-4* (Lee *et al.*, 1993). Sette anni dopo fu scoperto il secondo miRNA denominato *let-7* anch'esso determinante nel controllo dello sviluppo larvale nei nematodi (Reinhart *et al.*, 2000). Negli anni successivi

sono stati identificati, mediante colonaggio e sequenziamento di queste piccole porzioni di RNA, decine di miRNA negli esseri umani, nelle mosche e nei vermi; i miRNA sono ora definiti piccoli RNA silenziatori (“small silencing RNAs”) (Ghildiyal & Zamore, 2009). Dalla loro scoperta l'interesse per il ruolo dei miRNA nella regolazione genica è cresciuto esponenzialmente. Numerosi dati sperimentali hanno dimostrato come i miRNA siano coinvolti in svariati processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, differenziamento, trasduzione del segnale ed in processi fisiologici quali il metabolismo, l'embriogenesi e l'organogenesi (Kloosterman & Plasterk, 2006; Alvarez-Garcia & Miska, 2005).

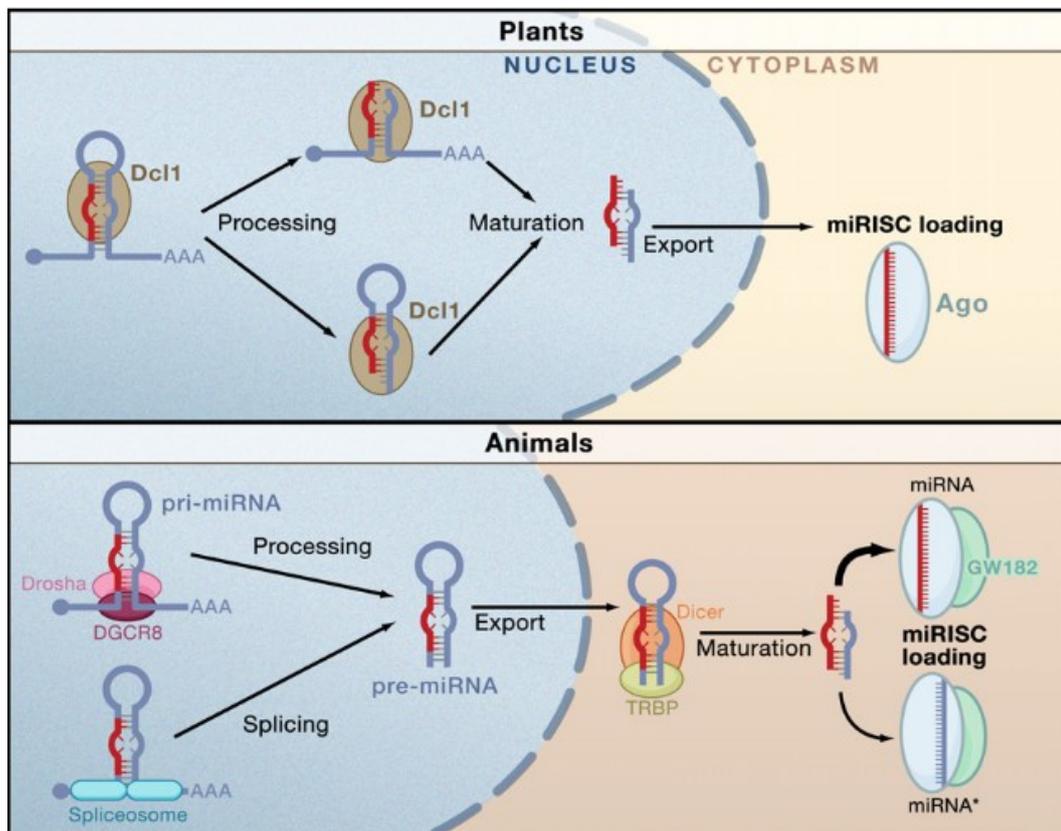
La biogenesi dei miRNA ha inizio mediante la trascrizione di una breve sequenza genomica autocomplementare denominata microRNA primario (pri-miRNA) generalmente trascritto dalla RNA polimerasi II (RNAPol II) e processato nel nucleo, mediante l'enzima Drosha, in un precursore di 60-70 nucleotidi (pre-miRNA) caratterizzato da una peculiare estremità di 2 nucleotidi a singolo filamento alle terminazioni 3' (Lee *et al.*, 2003). Questa estremità asimmetrica al 3' è legata dalla proteina esportina-5, che permette la traslocazione nel citoplasma del pre-miRNA (Lund *et al.*, 2004; Zeng, 2006). In *Drosophila* e nei mammiferi esistono anche vie differenti di processamento dei miRNA, che consentono la formazione di un pre-miRNA mediante meccanismi indipendenti da Drosha. Generalmente questi meccanismi riguardano miRNA localizzati in brevi introni (miRtrons), veicolati nel citoplasma direttamente dopo lo “splicing” (Berezikov *et al.*, 2007). Il pre-miRNA nel citoplasma viene riconosciuto a livello della estremità 3' da un complesso multienzimatico con attività endonucleasica chiamato Dicer; quest'ultimo completa la maturazione del miRNA tagliandolo nella sua forma finale a doppio filamento con 2 nucleotidi sporgenti all'estremità 3' (Meister & Tuschl, 2004). Successivamente i miRNA vengono incorporati nel complesso ribonucleoproteico dei miRNA (miRNP), noto anche come complesso silenziatore indotto da RNA (RISC). Il filamento selezionato e caricato nel RISC è solitamente quello che presenta energia libera minore al 5', mentre l'altro viene allontanato e degradato (Schwarz *et al.*, 2003). La biogenesi e le modalità d'azione dei miRNA presentano tratti distintivi tra il regno animale e quello vegetale (Figura 3); le piante non posseggono l'enzima Drosha e DCL1 (DICER-LIKE 1) è l'unico enzima responsabile sia della conversione da pri-miRNA a pre-miRNA sia del processamento del miRNA maturo, inoltre l'intero processo viene completato nel nucleo. In aggiunta, i nucleotidi al 3' del doppio filamento iniziale

miRNA/miRNA\* sono metilati dalla proteina HEN1, non presente negli animali. Infine, nel regno vegetale la maggior parte dei loci codificanti i miRNA sono rappresentati prevalentemente da miRNA intronici situati in geni non codificanti mentre nel regno animale da miRNA intronici in geni codificanti proteine. I miRNA evidenziano nelle piante complementarità di sequenza molto elevata, spesso perfetta, con i loro “target”; solitamente i siti bersaglio sono posizionati nelle UTRs ("untranslated regions") e ORFs ("open reading frame") al 5' e nelle UTRs al 3' oltre che in porzioni non codificanti le proteine evidenziando come il sistema RNA sia predisposto ad una regolazione diretta da parte dei miRNA. Il controllo dell'espressione genica avviene dunque a livello post-trascrizionale inducendo la degradazione di specifici mRNA oppure impedendo la traduzione della proteina. Come visto precedentemente, il meccanismo d'azione dipende dal grado di complementarità tra il miRNA e il suo mRNA bersaglio; l'appaiamento si verifica solitamente in una regione di 6-8 nucleotidi all'estremità 5' del miRNA detta "seed". Una ridotta omologia di sequenza, situazione predominante nel regno animale, porta generalmente alla repressione traduzionale senza degradazione dell'mRNA bersaglio; viceversa, se l'appaiamento alla regione 3'UTR degli mRNA bersaglio è perfetta, come nel regno vegetale, si verifica il taglio del messaggero e la sua successiva degradazione (Ambros, 2004).

## **2.2. I microRNA nelle piante**

La maggior parte dei geni codificanti miRNA è presente nel genoma come unità indipendenti (miRNA intergenici) o è localizzata all'interno di introni di altri geni, definiti ospiti, nello stesso orientamento o nell'orientamento opposto (Rodriguez *et al.*, 2004). I geni dei miRNA, nel regno vegetale, sono trascritti in un miRNA primario (pri-miRNA) mediante la RNA polimerasi II; la lunghezza del pri-miRNA può variare da settanta a poche centinaia di basi. Solitamente contengono una regione con imperfetta auto-complementarietà e prima di essere processati nella caratteristica struttura secondaria a “stem-loop” i pri-miRNA vengono stabilizzati attraverso la proteina nucleare Dawdle (DDL). Il pri-miRNA viene incapsulato all'estremità 5' e poliadenilato all'estremità 3' mentre le regioni introniche contenenti il pri-miRNA vengono unite (Xie *et al.*, 2005; Stepien *et al.*, 2016). A questo punto il pri-miRNA viene processato mediante il “dicing complex” composto dal DCL1, dal HYL1 (“hyponastic

leaves”) e da SE (“C2H2 zinc finger protein serrate”) composti chiave per l'ottenimento della doppia sequenza matura miRNA/miRNA\* (Park *et al.*, 2002; Fukudome & Fukuhara, 2017). In *Arabidopsis* sono state scoperte quattro diverse famiglie di endonucleasi DCL RNase III ma DCL1 risulta essere quello predominante per il processamento dei miRNA (Park *et al.*, 2002). DCL2, DCL3 e DCL4 producono diversi tipi di piccoli RNA interferenti (siRNA), inclusi siRNA endogeni e siRNA virali e transgenici (Gascioli *et al.*, 2005). Eccezione è rappresentata da alcuni miRNA come ad esempio miR822 e miR839 i quali sono generati dal DCL4 invece che dal DCL1 (Rajagopalan *et al.*, 2006).

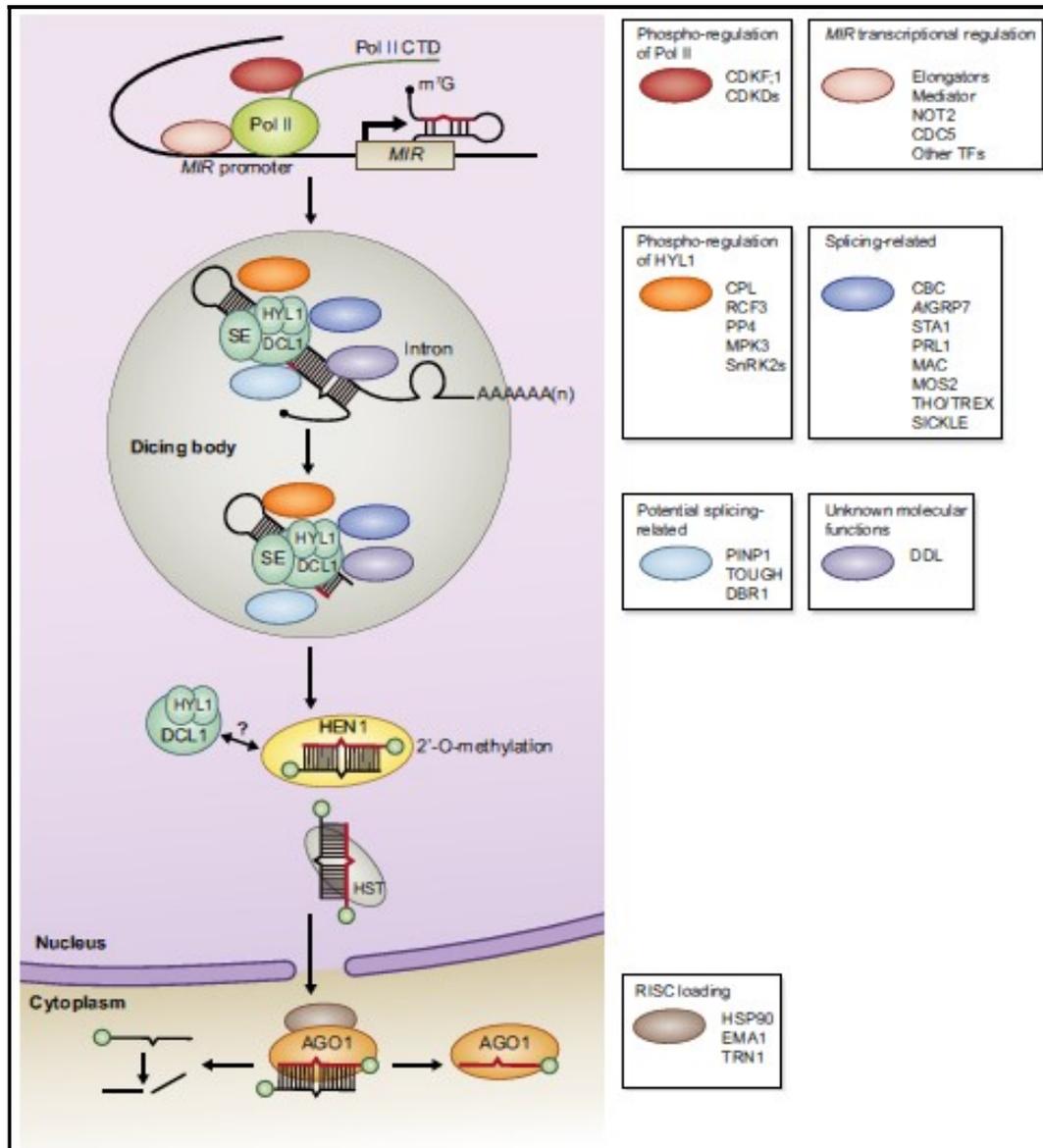


**Figura 3.** Biogenesi dei miRNA e loro assemblaggio nel complesso miRISC in piante e animali. Nelle piante il pri-miRNA viene processato in successione da DCL1; inizialmente vengono asportati l'anello di ripiegamento ed i segmenti laterali dando origine al pre-miRNA, poi, sempre ad opera di DCL1, viene prodotto il miRNA maturo che, una volta metilato, viene esportato nel citoplasma e caricato nel complesso RISC. Negli animali il pri-miRNA è processato ad opera di Drosha e della subunità DGCR8 per l'ottenimento del pre-miRNA. A questo punto il doppio filamento viene esportato dal nucleo ed elaborato dal “dicer” generando il miRNA maturo che successivamente viene assemblato nel complesso RISC (da Carthew & Sontheimer, 2009).

DCL1 processa il pri-miRNA nella classica conformazione a forcina in due step: il primo taglio viene eseguito a 15-17 nucleotidi di distanza dalla base del doppio filamento, successivamente il pre-miRNA ottenuto viene ulteriormente tagliato ottenendo il doppio filamento miRNA/miRNA\* di 21 nucleotidi (Song *et al.*, 2010).

Delle cinque famiglie di proteine con attività di legame verso i doppi filamenti a RNA ("double-stranded RNA-binding proteins", DRBs) HYL1/DRB1 è sicuramente la più importante nella fase di biogenesi dei miRNA mentre DRB2 è riscontrato influenzarne l'accumulo di diverse specie (Eamens *et al.*, 2012). HYL1 interagisce con DCL1 migliorandone l'efficienza e la precisione durante le fasi di elaborazione del precursore del miRNA (Yang *et al.*, 2014). Oltre a DCL1 e HYL1 anche la proteina SE è considerata componente chiave per la formazione del complesso denominato "dicing bodies" (D-bodies) responsabile del processamento dei miRNA in *Arabidopsis*. Mutazioni della proteina SE determinano una riduzione dei livelli di miRNA maturi, un incremento dei livelli dei pri-miRNA ed una riduzione dell'attività di "splicing" a loro carico (Grigg *et al.*, 2005).

Il doppio filamento miRNA/miRNA\* viene a questo punto metilato all'estremità 3' dalla metiltransferasi HEN1 ("Hua Enhancer1") la quale aggiunge un gruppo metile all'estremità 2'-OH del tratto terminale 3' di entrambi i filamenti (Figura 4). La metilazione è un processo fondamentale nell'evitare uridilazione e degradazione dei miRNA ad opera delle esonucleasi. Il doppio filamento metilato viene trasportato dal nucleo al citoplasma mediante la proteina HASTY, omologa dell'esportina-5 degli animali (Papp *et al.*, 2003). Una volta arrivato nel citoplasma uno dei due filamenti viene selezionato dalla proteina AGO1 e successivamente incorporato nel complesso RISC mentre l'altro viene degradato (Eldem *et al.*, 2013). La formazione del complesso RISC in *Arabidopsis* avviene mediante i seguenti processi: i) AGO1 ed una porzione della proteina da shock termico ("heat shock protein", HSP) HSP90 formano un dimero. ii) Il legame di HSP90 con adenosina trifosfato (ATP) causa una modificazione della conformazione di AGO1 che permette al miRNA a doppio filamento di essere incorporato nel complesso proteico AGO1-HSP90. iii) L'idrolisi dell'ATP induce la dissociazione tra AGO1 e HSP90. iv) AGO1 a causa della dissociazione di HSP90 cambia la propria conformazione, uno dei due filamenti viene rimosso e si ottiene il complesso RISC maturo (Iki *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Biogenesi dei microRNA (miRNA) nelle piante (da Yu *et al.*, 2017).

Il filamento incorporato nel RISC viene selezionato in funzione di diversi fattori; prima peculiarità è rappresentata dalla predisposizione della proteina AGO1 di incorporare filamenti aventi residui di uridina al terminale 5'. Altro fattore influente è la stabilità termodinamica dell'estremità 5', livelli minori di stabilità rispecchiano generalmente maggiori probabilità di selezione. Il miRNA funzionale guida a questo punto il RISC nell'attività di silenziamento mentre il filamento complementare viene velocemente degradato; la concentrazione dei filamenti miRNA\* complementari è generalmente molto

bassa nelle piante proprio a causa della loro rapida degradazione. Studi recenti hanno dimostrato come, al verificarsi di particolari condizioni, sia possibile rinvenire nelle piante elevate concentrazioni di miRNA\* complementari che possono intervenire nel medesimo "pathway" (Sunkar *et al.*, 2012).

### **2.3. Modalità d'azione dei miRNA**

I miRNA nelle piante regolano i propri geni “target” a livello post trascrizionale mediante due modalità: taglio del trascritto oppure blocco della sua traduzione (Roger & Chen, 2013). Come visto in precedenza, l'omologia di sequenza tra il miRNA e il suo “target” influenza la modalità d'azione con cui verrà svolto il silenziamento; il taglio del trascritto avviene solamente nel caso in cui si verifichi una complementarità quasi perfetta (Hurtvagner & Zamore, 2002). Nel regno vegetale i miRNA ed i loro mRNA “target” presentano complementarità molto elevata, proprio per questo la modalità d'azione più comune è rappresentata dal taglio dell'RNA messaggero (Chen, 2009).

#### **2.3.1. Taglio del trascritto**

Il taglio del trascritto guidato dai miRNA avviene in precise posizioni (Llave *et al.*, 2002) e ad opera del dominio PIWI presente nella proteina AGO1, il quale mediante ripiegamento esibisce attività endonucleasica; questo tipo di attività è stata dimostrata sia per AGO1, principale effettore in *Arabidopsis*, sia per AGO2, AGO4, AGO7 e AGO10 (Zhu *et al.*, 2011). Subito dopo il taglio i frammenti all'estremità 5' e 3' vengono degradati dalle esonucleasi; contrariamente ai frammenti posti all'estremità 3', i quali sono spesso rilevati nelle piante, i frammenti al 5' vengono individuati molto raramente probabilmente a causa della loro rapida degradazione. In *Chlamydomonas reinhardtii*, i frammenti al 5' sono poliadenilati dalla nucleotidil transferasi MUT68 e successivamente degradati dagli esosomi citoplasmatici (Ibrahim *et al.*, 2006). Il soppressore HEN1 (HESO1), omologo in *Arabidopsis* della transferasi MUT68, insieme al suo paralogo URT1 (UTP:RNA uridiltransferasi) sono responsabili della poliuridilazione dei frammenti al 5' *in vivo* ed *in vitro* (Wang *et al.*, 2015).

### **2.3.2. Inibizione della traduzione**

Nelle piante l'inibizione della traduzione dell'mRNA avviene molto meno frequentemente rispetto alla modalità di taglio descritta precedentemente. I primi esempi di soppressione della traduzione mediata da miRNA sono stati riscontrati in AP2 (APETALA 2) e SPL3 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3) regolati rispettivamente da miR172 e miR156/7 (Aukerman & Sakai, 2003). In presenza di concentrazioni anomale di questi miRNA i livelli di trascritti di AP2 e SPL3 erano comparabili a quelli dei controlli ma venivano registrate variazioni di concentrazione delle rispettive proteine (Chen, 2004). Fattori chiave necessari affinché avvenga l'inibizione della traduzione dell'mRNA sono l'enzima KATANIN1 (KTN1) (Brodersen *et al.*, 2008), il complesso di elaborazione ("P body") e la sua componente denominata VARICOSE (VCS) (Brodersen *et al.*, 2008), la proteina SUO ("GW-repeat protein") (Yang *et al.*, 2012) e la proteina AMP1 (ALTERED MERISTEM PROGRAM1) localizzata nella membrana del reticolo endoplasmatico (Li *et al.*, 2013). L'assemblaggio di tutti questi fattori consente di generare un'associazione stabile tra il complesso RISC ed mRNA bersaglio impedendone la traduzione.

### **2.4. Ruolo dei miRNA nello sviluppo**

Le prime segnalazioni inerenti il ruolo degli "small RNAs" nello sviluppo delle piante sono riferite ad individui mutanti che presentavano delle deficienze nella loro biogenesi o nelle loro funzioni. Sviziati geni determinanti per la biogenesi e la funzionalità dei miRNA come ad esempio DCL1, AGO1, HEN1, SE, DDL e HYL1 sono stati riscontrati essere fondamentali nei processi di sviluppo delle piante, esaminando le conseguenze delle loro mutazioni in alcune piante test, ancor prima di conoscere il loro ruolo nella biogenesi dei miRNA (Jones-Rhoades *et al.*, 2006, Chen, 2009). Il ruolo dei miRNA è ritenuto fondamentale in diversi programmi di sviluppo nelle piante come ad esempio nell'emissione e nella successiva crescita delle radici, nello sviluppo dei tessuti vascolari, nella morfogenesi e polarità delle foglie, nella differenziazione dei fiori e nella regolazione della loro fase transitoria tra crescita vegetativa e crescita riproduttiva (Chen, 2009).

## **2.5. Regolazione delle fasi transitorie**

In *Arabidopsis thaliana* e *Zea Mais* è stato dimostrato che le fasi di transizione del loro sviluppo sono coordinate dall'attività antagonistica tra miR156 e miR172; durante lo sviluppo delle foglie, ad esempio, si assiste ad una diminuzione dei livelli di miR156 ed ad un aumento di miR172 (Schwab *et al.*, 2005; Chuck *et al.*, 2007). Anche i loro “target”, ossia i fattori di trascrizione “Squamosa Promoter Binding ProteinLike” (SPL) e APETALA2 (AP2) rispettivamente, sono espressi attraverso patterns complementari. Concentrazioni crescenti di miR156, in concomitanza a ridotta attività di miR172, limitano le transizioni da una fase evolutiva all'altra, prolungano la fase giovanile e ritardano la fioritura (Chuck *et al.*, 2007). Contrariamente, bassi livelli di miR156 velocizzano il raggiungimento della fase adulta nelle foglie ed inducono precocemente la fioritura; effetti simili sono riscontrati in piante con ridotta attività di AP2, “target” di miR172. Concentrazioni maggiori di miR172 inibiscono l'attività di alcuni repressori della fioritura come SMZ, SNZ, TOE1 e TOE2 (Aukerman & Sakai, 2003). Anche miR390 risulta essere coinvolto in questi processi di transizione promuovendo la produzione di ta-siRNA, trascritto da TAS3, il quale inibisce i fattori di risposta dell'auxina 3 e 4 (ARF3-ARF4). Rubio-Somoza e Weigel (2011) ipotizzano che ARF3 possa promuovere l'espressione di SPLs i quali risulterebbero però repressi dall'attività di AP2; viene dunque proposto un modello in cui miR172 agendo su AP2 diminuirebbe i livelli di SPL mediante la sotto regolazione del suo attivatore ARF3 (Rubio & Weigel, 2011).

## **2.6. Regolazione della crescita fogliare**

Il complesso miR390-TAS3-ARF3/4 è coinvolto anche nella regolazione della crescita abassiale e adassiale delle foglie durante il loro sviluppo. Durante questo processo suddetto complesso è aiutato nell'esplicare la propria azione anche da fattori di trascrizione HD-ZIP III denominati PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV) e REVOLUTA (REV) regolati a loro volta da miR165 e miR166 (Emery *et al.*, 2003). Questi due miRNA regolano l'accumulo di queste proteine nella pagina superiore ed inferiore della foglia controllandone lo sviluppo. Anche PHB e REV giocano un ruolo importante nella crescita delle foglie regolando l'accrescimento dei tessuti vascolari; malformazioni e defezioni sono state riscontrate in piante in cui PHB e REV sfuggivano al controllo di miR165 e miR166. Defezioni nello sviluppo sono state riscontrate anche in piante ove miR159 risultava non

esplicare la sua azione inibitoria sui propri “target” MYB TF (in particolare MYB33 e MYB65), azione necessaria per un corretto sviluppo dei tessuti vascolari delle foglie.

Fattori di trascrizione come CUC1 e CUC2 (CUP-SHAPER COTYLEDON) regolati da miR164 ricoprono un ruolo importante nel definire le zone di confine dei vari organi vegetali durante il loro sviluppo, nel regolare la crescita dei fiori e la morfologia fogliare (Baker *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2007). Piante in cui l'azione di questi miRNA è compromessa evidenziano sviluppi anomali come cotiledoni fusi tra loro, stami non separati ed un numero anomalo di petali e sepali (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). L'azione di miR164 è influenzata a sua volta dal fattore di trascrizione TCPs regolato da miR319, il quale può legarsi alla sequenza regolatrice di miR164 modulandone i livelli di espressione. Questi due miRNA agiscono in sinergia e la mancata attività di uno dei due porta alla comparsa di fenotipi aberranti (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). L'azione congiunta dei fattori di trascrizione regolati da miR164 e miR319 influisce anche sulla formazione del margine fogliare; piante in cui tale “network” non era normalmente regolato evidenziavano margini fogliari seghettati ed anormali. L'abilità di miR319 sulla regolazione della proliferazione cellulare è, a sua volta, parzialmente influenzata da miR396 il quale, avendo come “target” i fattori di trascrizione GRF (“Growth-Regulating Factor”), regola la proliferazione dei tessuti (Eldem *et al.*, 2013). Sebbene ci siano diverse testimonianze del ruolo di questi miRNA nel controllo dello sviluppo fogliare non risulta ancora chiaro come queste diverse vie metaboliche, regolate da miR164, miR319 e miR396, interagiscano tra loro (Rubio-Somoza & Weigel, 2011).

## **2.7. Regolazione del processo riproduttivo**

Svariati sono i geni codificanti miRNA che esplicano un'azione di regolazione sui vari processi riproduttivi come ad esempio l'architettura fiorale, l'organogenesi e la maturazione degli organi riproduttivi. Ruolo predominante nella loro regolazione è svolto da miR156 e miR172; nelle infiorescenze di mais tali miRNA regolano sia i tessuti meristemati della spiga sia l'organogenesi (Chuck *et al.*, 2007). Comportamento analogo è stato riscontrato anche in *Arabidopsis* dove il binomio miR156-miR172, agendo sul fattore di trascrizione AP2, determina l'identità degli organi fiorali come calice, corolla, petali e sepali (Chen, 2009). Livelli di espressione molto bassi di miR159 possono generare sterilità maschile e ritardata fioritura in *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2009). Sempre in *Arabidopsis* miR167, agendo

su ARF6 e ARF8, regola lo sviluppo di ovulo ed antere (Chen, 2009); ruoli determinanti nel processo riproduttivo sono stati inoltre proposti per miR169 in *Petunia hybrida* e *Antirrhinum majus* e per miR5200 in *Brachypodium distachyon* (Chen, 2009; Wu *et al.*, 2013).

## **2.8. Regolazione dello sviluppo radicale**

Lo sviluppo radicale si basa prevalentemente sul controllo della crescita delle radici secondarie e dei peli radicali; le auxine hanno un ruolo determinante in questi processi e vengono regolate da diversi miRNA. Lo sviluppo iniziale delle radici è mediato da NAC1 “target” di miR164 e miR160 il quale a sua volta regola diversi fattori di risposta all'auxina come ARF10, ARF16 e ARF17 (Guo *et al.*, 2005). In un secondo momento entra in gioco anche miR390 innescando la produzione di ta-siRNA trascritto a sua volta da TAS3 e avente come “target” altri due fattori di risposta all'auxina ossia ARF3 e ARF4 (Adenot *et al.*, 2006). Successivamente, durante l'emissione e l'allungamento delle radici secondarie entrano in gioco anche miR167 e miR393 aventi come “target”s rispettivamente ARF8 e AFB3 ("Auxin-signaling F-box").

## **2.9. Regolazione della senescenza**

La senescenza nelle piante è un processo regolato principalmente da due miRNA ossia miR164 e miR319. In *Arabidopsis* è stato dimostrato come il primo tenda a diminuire con l'avanzare dell'età determinando un conseguente accumulo dei suoi “target” quali NAC1, ORE1 e At5g61430 (Kim *et al.*, 2009); contrariamente, la sua sovraespressione, o la riduzione dell'attività di ORE1, promuove la longevità dei tessuti. Comportamento opposto è invece quello di miR319 il quale agisce inibendo i processi di senescenza; il suo “target” (TCP) influisce i processi di invecchiamento cellulare mediante attivazione della lipossigenasi2 (LOX2), uno dei principali enzimi coinvolti nella via metabolica dell'acido jasmonico (Schommer *et al.*, 2008). Oltre ad etilene ed acido jasmonico anche le auxine giocano un ruolo chiave nel regolare questi processi metabolici; proprio a tale proposito interviene nella regolazione della senescenza anche il miR390 che avendo come “target” ARF2 esplica un ruolo fondamentale nel determinare l'inizio del processo di senescenza e nel regolare l'abscissione degli organi fiorali (Rubio-Somoza & Weigel, 2011).

## 2.10. Ruolo in risposta a stress abiotici

Le risposte delle piante agli stress sono mediate da meccanismi multipli e i miRNA sono spesso considerati composti chiave nella regolazione dell'omeostasi cellulare (Leung & Sharp, 2010). Durante lo stress, la crescita e lo sviluppo vengono bloccati e tutte le risorse vengono utilizzate per adattarsi alla nuova condizione. I principali e più conservati miRNA nel regno vegetale hanno come “target” mRNA codificanti diverse famiglie di fattori di trascrizione; i livelli di questi miRNA e dei loro geni “target” sono dimostrati essere regolati durante l'esposizione allo stress, suggerendo un controllo attivo anche dello sviluppo e della crescita (Khraiwesh *et al.*, 2012). Sovraespressioni di miR393, miR160 e miR167 sono state osservate durante fenomeni di siccità e di salinità oltre che dopo l'esposizione ad altri stress abiotici quali sale, acido abscissico, raggi UV-B, calore e freddo (Sunkar *et al.*, 2012). Come accennato precedentemente questi tre miRNA sono implicati nella regolazione dell'auxina avendo come “target” TIR1/AFB ed i fattori di trascrizione auxina dipendenti ARF. Durante lo stress la sovraespressione di miR393 contribuisce a sopprimere la segnalazione della via di produzione dell'auxina riducendo i livelli di espressione di TIR1 e conseguentemente incrementando l'etero-dimerizzazione del complesso AUX/IAA-ARF liberando ARF. In aggiunta, nel suddetto sistema di regolazione entrano in gioco anche miR160 e miR167 regolando negativamente i livelli di ARF (Sunkar *et al.*, 2012). L'azione di questi tre miRNA blocca dunque l'espressione genica mediata dal complesso ARF riducendo il tasso di crescita della pianta durante l'esposizione allo stress e promuovendo meccanismi di tolleranza (Sunkar *et al.*, 2012). Le funzioni dei miRNA più conosciuti sono riassunte sotto.

Il miR169 sembrerebbe avere un ruolo determinante nella risposta agli stress; in *Arabidopsis* livelli più bassi di questo miRNA permettono una maggior espressione di NFYA5, fattore importante per la risposta alla siccità. Curiosamente, l'espressione di questo miRNA durante l'esposizione a stress idrici in piante di riso tende ad aumentare contrariamente a quanto riportato in piante di *Arabidopsis* e *Medicago truncatula* (Sunkar *et al.*, 2012).

Il miR168 è stato dimostrato essere regolato durante diversi stress come siccità, calore, salinità ed esposizione a raggi UV-B. Sembra venga trascrizionalmente co-regolato insieme al suo “target” AGO1 permettendo di regolare l'omeostasi cellulare in ciascuna cellula ove il miRNA sta funzionando (Khraiwesh *et al.*, 2012).

Anche miR171 viene modulato in risposta a siccità o ad altri stress abiotici (Zhang *et al.*, 2010); questo miRNA ha come “target” il fattore di trascrizione SCL (“scarecrow-like family”) il quale funge da antagonista del repressore di crescita DELLA in *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2011) promuovendo il segnale coinvolto nella via metabolica delle gibberelline.

Il miR396 è stato identificato in diverse piante come miRNA di risposta a stress salino, è stato inoltre associato ad altri fattori di stress quali siccità e freddo. In piante di riso e di *Arabidopsis* la sua sovraespressione riduce la tolleranza alla salinità (Peng *et al.*, 2010).

Studi recenti dimostrano variazioni nei livelli di espressione del miR398, il quale ha come target due superossido dismutasi Cu/Zn (CSD1 e CSD2), durante l'esposizione a stress salino. Questo stress limita la presenza di miR398 generando maggiori livelli di espressione del suo “target”. Questo processo è necessario affinché i ROS accumulatisi durante l'esposizione allo stress, vengano detossificati da CSD1 e CSD2 mediante variazioni di concentrazione del miR398 (Sunkar *et al.*, 2012).

### **3. I FITOPLASMI**

#### **3.1. Caratteristiche generali**

I fitoplasmi sono batteri fitopatogeni appartenenti alla classe *Mollicutes* (IRPCM, 2004). Sono considerati le più piccole forme di vita conosciute, dalle dimensioni estremamente contenute, variabili dai 200 nm agli 800 nm di diametro e caratterizzati da mancanza di parete cellulare, che si riflette nella loro struttura pleomorfa (Lee *et al.*, 2000). Sono procarioti con un genoma di 680-1.600 kb ed un contenuto di guanina e citosina compreso tra 23-26% (Sears *et al.*, 1989), in alcuni casi tale percentuale scende al di sotto del 23%, ritenuto il livello soglia per un genoma vitale (Muto & Osawa, 1987). Nonostante la ridotta dimensione del genoma, molti geni sono presenti in molteplici copie; è nota infatti la presenza di due operoni dell'RNA ribosomico, la cui eterogeneità è stata dimostrata per alcuni ceppi di fitoplasmi (Liefing *et al.*, 1996, 2004; Bertaccini *et al.*, 2005). Il genoma contiene anche trasposoni e sequenze di inserzione che ne incrementano la variabilità facilitandone la sopravvivenza in piante ed in insetti (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006).

Queste sequenze sono state nominate mosaici variabili (SVM) (Jomantiene & Davis, 2006; Jomantiene *et al.*, 2007) oppure potenziali unità mobili, PMU (Bai *et al.*, 2006). Altri studi mediante sonde a DNA hanno determinato che in quasi tutti i fitoplasmi è presente DNA extracromosomico con struttura simile a quella dei plasmidi batterici (Lee & Davis 1988; Bertaccini *et al.*, 1990; Kuske *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1993). Le ridotte dimensioni genomiche appaiono la conseguenza di un processo di evoluzione degenerativa che ha comportato l'eliminazione graduale di sequenze nucleotidiche da progenitori rappresentati da batteri Gram-positivi (*Bacillus subtilis*). Sebbene il genoma del fitoplasma contenga geni di base con funzioni cellulari come replicazione del DNA, trascrizione, traduzione e traslocazione di proteine (Kakizawa *et al.*, 2001), manca di molti geni metabolici. In generale, infatti, come gli altri micoplasmi sono privi di geni per il ciclo dell'acido tricarbossilico, per la biosintesi di steroli e acidi grassi, per la sintesi *de novo* dei nucleotidi e la biosintesi della maggior parte degli amminoacidi, caratteristiche che li rendono dipendenti dal loro ospite (Razin *et al.*, 1998).

I fitoplasmi, inizialmente denominati “mycoplasma-like organism”, “MLO” (Doi *et al.*, 1967), vivono nel floema delle piante e nell'emolinfa degli insetti vettori; sono trasmessi da insetti floemomizi quali cicadellidi, cixiidi e psillidi, e sono associati a numerose malattie di piante anche economicamente molto importanti come viti, piante da frutto ed ornamentali (Hogenhout *et al.*, 2008; Bertaccini & Duduk, 2010; Oshima *et al.*, 2013). Le piante infette mostrano sintomi peculiari, riconducibili ad un alterato equilibrio tra i regolatori di crescita e ad una mancata funzionalità floematica: giallumi, nanismo, proliferazione dei germogli ascellari (scopazzi), fillodia (sviluppo di foglie al posto dei carpelli fiorali), virescenza, arrossamenti di foglie e fusti, necrosi. Più sintomi possono essere presenti contemporaneamente ed in alcuni casi la sintomatologia, specialmente nelle piante perenni, può risultare mortale. I sintomi associati ad infezioni da fitoplasmi variano considerevolmente nelle diverse piante ospiti, in funzione di numerosi fattori fra i quali lo stadio dell'infezione ed in ultima analisi le interazioni metaboliche che intercorrono tra i fitoplasmi e le specie ospiti e l'alterazione in queste ultime di geni omeotici (Bertaccini, 2007; Himeno *et al.*, 2011; Bertaccini *et al.*, 2014).

### 3.2. Classificazione

A livello tassonomico i fitoplasmi sono collocati nella classe *Mollicutes* ("mollis", molle, "cutis", pelle, in latino) del "phylum" *Tenericutes* (Brown *et al.*, 2010). I mollicuti si sono evoluti come una branca di *Firmicutes* attraverso un processo di evoluzione riduttiva o degenerativa. Durante questo processo, i *Mollicutes* hanno perso significative sequenze genomiche, ritenute essenziali per la vita. Studi di analisi delle sequenze del DNA ribosomico 16S rDNA e altri geni conservati suggeriscono che i fitoplasmi comprendono un grande, discreto, gruppo monofiletico, strettamente correlato agli acholeplasmii (Lee *et al.*, 2010). Inizialmente, l'individuazione di questi microorganismi era affidata alle osservazioni mediante microscopio con colorazione di DAPI o attraverso il microscopio elettronico; dall'inizio degli anni '90, grazie all'impiego del DNA ricombinante, gli studi filogenetici e tassonomici sono potuti progredire più velocemente e in maniera più accurata, permettendo così di distinguere questi procarioti in diversi gruppi ribosomici (Lee *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1998). Nonostante sia stata provata la loro capacità di crescere in substrato artificiale (Contaldo *et al.*, 2012; 2016), la loro cultura non risulta ancora pratica comune quindi per la loro classificazione è ancora necessario l'impiego di 'Candidatus Phytoplasma' (IRPCM, 2004), che fa riferimento ad una sequenza unica >1200 nt (gene 16S rRNA) con un coefficiente di similarità inferiore al 97.5% rispetto a tutti gli altri precedentemente descritti. I fitoplasmi sono classificati anche in gruppi e sottogruppi in base all'analisi RFLP di un segmento del gene 16S rRNA di 1,25 kb, utilizzando un insieme definito di 17 enzimi di restrizione (Lee *et al.*, 1998). I gruppi ribosomici sono inoltre stati suddivisi in sottogruppi distinti sulla base dell'analisi RFLP (Lee *et al.*, 1998, 2007) effettuata direttamente o *in silico*, con un programma disponibile online (*iPhyClassifier*, Zhao *et al.*, 2009), in grado di eseguire analisi di omologia di sequenza e simulazioni di restrizioni enzimatiche. Un nuovo sottogruppo ribosomico viene riconosciuto se il profilo di restrizione complessivo ha un coefficiente di somiglianza di 0,97 o inferiore rispetto ai sottogruppi precedentemente designati all'interno di un determinato gruppo (Wei *et al.*, 2008). In alcuni casi la sola analisi della sequenza del gene 16S rRNA non è sufficiente e quindi è possibile prendere in considerazione anche alcune caratteristiche biologiche ed ecologiche. L'identificazione di specie diverse all'interno del genere 'Ca. Phytoplasma' è infatti possibile nel caso sussistano le seguenti condizioni: (i) che i due fitoplasmi siano trasmessi da vettori diversi; (ii) che in

natura abbiano ospiti vegetali diversi; (iii) che vi siano differenze molecolari significative (IRPCM, 2004). Ad oggi, esistono 43 specie ‘*Candidatus*’ e 36 gruppi ribosomici (Tabella1).

<b>Gruppo ribosomico</b>	<b>Sottogruppo ribosomico malattia (acronimo) e ‘<i>Candidatus</i>’ ove presente</b>	<b>Codice GenBank</b>
<b>16SrI</b>	I-A Aster yellows witches’ broom (AYWB)	NC007716
	I-B Onion yellows mild strain (OY-M) ‘ <i>Ca. P. asteris</i> ’	NC005303
	I-C Clover phyllody (CPh)	AF222065
	I-D Paulownia witches’ broom (PaWB)	AY265206
	I-E Blueberry stunt (BBS3)	AY265213
	I-F Aster yellows apricot-Spain (A-AY)	AY265211
	I-I Strawberry witches’ broom (STRAWB1)	U96614
	I-K Strawberry witches’ broom (STRAWB2)	U96616
	I-L Aster yellows (AV2192)	AY180957
	I-M Aster yellows (AVUT)	AY265209
	I-N Aster yellows (IoWB)	AY265205
	I-O Soybean purple stem (SPS)	AF268405
	I-P Aster yellows da pioppo (PopAY)	AF503568
	I-Q Cherry little leaf (ChLL)	AY034089
	I-R Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	AY102275
	I-S Mexican potato purple top phytoplasma (COAH10)	FJ914654
	I-U Mexican potato purple top phytoplasma (JAL6)	FJ914650
	I-V Mexican potato purple top phytoplasma (SON18)	FJ914642
	I-W Peach rosette-like disease (PRU0382)	HQ450211
I-Y “Brote grande” of tomato ‘ <i>Ca. P. lycopersici</i> ’	EF199549	
<b>16SrII</b>	II-A Peanut witches’ broom (PnWB)	L33765
	II-B Lime witches’ broom (WBDL) ‘ <i>Ca. P. aurantifolia</i> ’	U15442
	II-C Fava bean phyllody (FBP)	X83432
	II-D Papaya mosaic (PpM) ‘ <i>Ca. P. australasia</i> ’	Y10096
	II-E <i>Pichris echioides</i> phyllody (PEY)	Y16393
	II-F Cotton phyllody (CoP)	EF186827
	II-G Cactus witches’ broom YN23	EU099568
	II-H Cactus witches’ broom YN24	EU099569
	II-I Cactus witches’ broom YN06	EU099551
	II-J Cactus witches’ broom YN07	EU099552
	II-K Cactus witches’ broom YN28	EU099572
	II-L Cactus witches’ broom YN01	EU099546
	II-M <i>Tephrosia purpurea</i> witches’ broom	HG792252
	II-N Papaya bunchy top BTSpLT01-IIN	JF781309
	II-O <i>Tabebuia pentaphylla</i> witches’ broom	EF647744
	II-P Cuban papaya	DQ286948
	II-Q Papaya bunchy top BTSpHav02-IIA	JF781310
	II-R <i>Echinopsis</i> sp. yellow patch	DQ535900
	II-S <i>Amaranthus hypochondriacus</i> 52A	FJ357164
	II-T Tomatillo witches’ broom clone 5-5	EU125185
II-U Papaya little leaf disease	KP057205	

	II-V <i>Praxelis clematidea</i> phyllody disease	KY568717
	II-W <i>Crotalaria</i> witches' broom	EF656453
	II-Z Abarkooh sunflower phyllody (ASP)	KJ016231
<b>16SrIII</b>	III-A Peach X-disease (PX11CT1) ' <b><i>Ca. P. pruni</i></b> '	JQ044392/JQ044393
	III-B Clover yellow edge (CYE)	AF173558
	III-C Pecan bunch (PB)	GU004371
	III-D Goldenrod yellows (GR1)	GU004372
	III-E Spiraea stunt (SP1)	AF190228
	III-F Milkweed yellows (MW1)	AF510724
	III-G Walnut witches' broom (WWB)	AF190226/AF190227
	III-H Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223
	III-I Virginia grapevine yellows (VGYIII)	AF060875
	III-J Chayote witches' broom (ChWBIII)	AF147706
	III-K Strawberry leafy fruit (SLF)	AF274876
	III-L Cassava frog skin disease (CFSD)	EU346761
	III-M Potato purple top (MT117)	FJ226074
	III-N Potato purple top (AKpot6)	GU004365
	III-P Dandelion virescence (DanV)	AF370119/AF370120
	III-Q Black raspberry witches' broom (BRWB7)	AF302841
	III-T Sweet and sour cherry (ChD)	FJ231728
III-U <i>Cirsium</i> white leaf (CWL)	AF373105/AF373106	
	III-V Passion fruit phytoplasma (PassWB-Br4)	GU292082
<b>16SrIV</b>	IV-A Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307
	IV-B Yucatan coconut lethal decline (LDY)	U18753
	IV-C Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	X80117
	IV-D Texas Phoenix Palm Decline	HQ414260
	IV-E Rep. Dom. Coconut lethal yellowing (CLYDR)	DQ631640
	IV-F Washingtonia roibusta Coconut lethal yellowing	KX982666
<b>16SrV</b>	V-A Elm yellows (EY) ' <b><i>Ca. P. ulmi</i></b> '	AY197655
	V-B Jujube witches' broom (JWB-G1) ' <b><i>Ca. P. ziziphi</i></b> '	AB052876
	V-C "Flavescence dorée" (FD-C)	X76560
	V-D "Flavescence dorée" (FD-D)	AJ548787
	V-E Rubus stunt (RuS) ' <b><i>Ca. P. rubi</i></b> '	AY197648
	V-F <i>Balanites</i> witches' broom (BltWB) ' <b><i>Ca. P. balanitae</i></b> '	AB689678
	V-G Jujube witches' broom Korea (JWB-Kor1)	AB052879
V-H <i>Bischofia polycarpa</i> witches' broom	KJ452548	
	V-I Persimmon Fasciation	KF995724
<b>16SrVI</b>	VI-A Clover proliferation (CP) ' <b><i>Ca. P. trifolii</i></b> '	AY390261
	VI-B Strawberry multiplier disease (MC)	AF190224
	VI-C Illinois elm yellows (EY-IL1)	AF409069/AF409070
	VI-D Periwinkle little leaf (PLL-Bd)	AF228053
	VI-E <i>Centarurea solstitialis</i> virescence (CSVI)	AY270156
	VI-F <i>Catharanthus</i> phyllody phytoplasma (CPS)	EF186819
	VI-H Portulaca little leaf phytoplasma (PLL-Ind)	EF651786
	VI-I Passionfruit (WB-Br4) ' <b><i>Ca. P. sudamericanum</i></b> '	GU292081
<b>16SrVII</b>	VII-A Ash yellows (AshY) ' <b><i>Ca. P. fraxini</i></b> '	AF092209
	VII-B Erigeron witches broom (EriWB)	AY034608
	VII-C Argentinian alfalfa witches' broom (ArAWB)	AY147038

	VII-D Erigeron witches' broom	KJ831066
	VII-E Chilean grapevine yellows	AY741531
	VII-F Vernonia shoot proliferation	KX342018
<b>16SrVIII</b>	VIII-A Loofah witches' broom (LufWB) ' <i>Ca. P. luffae</i> '	AF086621
	IX-A Pigeon pea witches' broom (PPWB)	AF248957
	IX-B Almond witches' broom ' <i>Ca. P. phoenicium</i> '	AF515636
	IX-C Naxos periwinkle virescence (NAXOS)	HQ589191
<b>16SrIX</b>	IX-D Almond witches' broom (21) (AlWB)	AF515637
	IX-E <i>Juniperus</i> witches' broom	GQ925918
	IX-F Almond and stone fruit witches' broom (N27-2)	HQ407532
	IX-G Almond and stone fruit witches' broom (A1-1)	HQ407514
	IX-H <i>Brassica campestris</i> phyllody – Pakistan	KT253604
	X-A Apple proliferation (AP) ' <i>Ca. P. mali</i> '	AJ542541
<b>16SrX</b>	X-B European stone fruit yellows ' <i>Ca. P. prunorum</i> '	AJ542544
	X-C Pear decline (PD) ' <i>Ca. P. pyri</i> '	AJ54254
	X-D Spartium witches' broom (SpaWB) ' <i>Ca. P. spartii</i> '	X92869
	X-E Black alder witches' broom [BAWB(BWB)]	X76431
	XI-A Rice yellow dwarf (RYD) ' <i>Ca. P. oryzae</i> '	AB052873
<b>16SrXI</b>	XI-B Sugar cane white leaf (SCWL)	X76432 /KC662509
	XI-C Leafhopper-borne (BVK)	X76429
	XI-D sugarcane white leaf (SCWL)	KR020686
	XI-E Sugarcane Grassy Shoot disease in India	HF586648
	XII-A "Stolbur" (STOL11) ' <i>Ca. P. solani</i> '	AF248959
<b>16SrXII</b>	XII-B Australian grapevine yellows ' <i>Ca. P. australiense</i> '	L76865
	XII-C Strawberry lethal yellows (StrawLY)	AJ243045
	XII-D Japanese hydrangea phyllody ' <i>Ca. P. japonicum</i> '	AB010425
	XII-E Yellows diseased strawberry ' <i>Ca. P. fragariae</i> '	DQ086423
	XII-F "Bois noir" (BN-Op30)	EU836630
	XII-G "Bois noir" (BN-Fc3)	EU836647
	XII-H Bindweed yellows (BY-S57/11) ' <i>Ca. P. convolvuli</i> '	JN833705
	XIII-A Mexican periw. virescence ' <i>Ca. P. hispanicum</i> '	AF248960
<b>16SrXIII</b>	XIII-B Strawberry green petal (SGP)	U96616
	XIII-C Chinaberry yellows (CbY1)	AF495882
	XIII-D Mexican potato purple top phytoplasma	KM390803
	XIII-E Papaya apical curl necrosis (PACN)	JX893518
	XIII-F Strawberry red leaf	KJ921644
	XIII-G Melia azedarach yellows ' <i>Ca. P. meliae</i> '	KU850943
	XIII-J Strawberry Fruit Phyllody-Brazil	EU71910
<b>16SrXIV</b>	XIV-A Bermuda grass white leaf ' <i>Ca. P. cynodontis</i> '	AJ550984
	XIV-B Bermuda grass white leaf Iran	EF444485
<b>16SrXV</b>	XV-A Hibiscus witches' broom ' <i>Ca. P. brasiliense</i> '	AF147708
	XV-B Guazuma witches' broom (GWB)	HQ258882
<b>16SrXVI</b>	XVI-A Sugarcane yellow leaf syndrome ' <i>Ca. P. graminis</i> '	AY725228
<b>16SrXVII</b>	XVII-A Papaya bunchy top ' <i>Ca. P. caricae</i> '	AY725234
<b>16SrXVIII</b>	XVIII-A Am. potato purple top wilt ' <i>Ca. P. americanum</i> '	DQ174122
<b>16SrXIX</b>	XIX-A Chestnut witches' broom ' <i>Ca. P. castaneae</i> '	AB054986
<b>16SrXX</b>	XX-A Rhamnus witches' broom ' <i>Ca. P. rhamni</i> '	AJ583009

<b>16SrXXI</b>	XXI-A Pinus phytoplasma (PinP) ' <i>Ca. P. pini</i> '	AJ310849
<b>16SrXXII</b>	XXII-A Lethal yellow disease (LYDM) ' <i>Ca. P. palmicola</i> '	KF751388
	XXII-B Cape St. Paul wilt disease (CSPW)	KF419286
<b>16SrXXIII</b>	XXIII-A Buckland Valley grapevine yellows	AY083605
<b>16SrXXIV</b>	XXIV-A Sorghum bunchy shoot	AF509322
<b>16SrXXV</b>	XXV-A Weeping tea witches broom	AF521672
<b>16SrXXVI</b>	XXVI-A Sugarcane phytoplasma D3T1	AJ539179
<b>16SrXXVII</b>	XXVII-A Sugarcane phytoplasma D3T2	AY539180.
<b>16SrXXVIII</b>	XXVIII-A Derbid phytoplasma	AY744945
<b>16SrXXIX</b>	XXIX-A Cassia witches' broom ' <i>Ca. P. omanense</i> '	EF666051
<b>16SrXXX</b>	XXX-A Salt cedar witches' broom ' <i>Ca. P. tamaricis</i> '	FJ432664
<b>16SrXXXI</b>	XXXI-A Soybean stunt (SoyST1cl) ' <i>Ca. P. costaricanum</i> '	HQ225630
<b>16SrXXXII</b>	XXXII-A Malaysian per. virescence ' <i>Ca. P. malaysianum</i> '	EU371934
	XXXII-B Malayan yellow dwarf phytoplasma (MYD)	EU498727
	XXXII-C Malayan oil palm phytoplasma (MOP)	EU498728
<b>16SrXXXIII</b>	XXXIII-A Allocasuarina phytopl. ' <i>Ca. P. allocasuarinae</i> '	AY135523
<b>16SrXXXVI</b>	XXXVI-A Yellow decl. of foxtail palm ' <i>Ca. P. wodyetiae</i> '	KC844879
<b>Non designato</b>	Bogia coconut sybdrome and banana wilt disease ' <i>Ca. P. noviguineense</i> '	LC228755

**Tabella 1.** Classificazione dei fitoplasmi come '*Candidatus*' specie e gruppi ribosomici e relativi numeri di accesso a GenBank.

Dal momento che il gene 16S rRNA è altamente conservato, spesso non permette di poter differenziare e caratterizzare accuratamente ceppi di fitoplasmi filogeneticamente molto correlati tra loro. Sono quindi stati individuati diversi "markers" genetici, più informativi per i diversi gruppi ribosomici, geni a singola copia codificanti: proteine ribosomiche (rpl22 e rpS3), *secY*, *secA*, *tuf*, *vmp1*, *stamp* e *groEl* (Gundersen *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997; Marcone *et al.*, 2000; Martini *et al.*, 2002; 2007; Wei *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; 2006; Hodgetts *et al.*, 2008; Cimerman *et al.*, 2009; Fabre *et al.*, 2011; Mitrović *et al.*, 2011a; 2011b). Questi studi hanno rivelato che l'analisi filogenetica basata sui geni sopra citati era congrua con quella eseguita sulla sequenza 16S rDNA e la loro analisi ha fornito utili strumenti molecolari per la delimitazione di ceppi geneticamente e/o ecologicamente distinti, importanti per studi epidemiologici (Marcone, 2014). Una accurata differenziazione risulta infatti necessaria per studi epidemiologici che sono alla base della gestione corretta delle malattie associate alla presenza di fitoplasmi per caratterizzare i ceppi associati allo scoppio delle diverse epidemie (Bertaccini *et al.*, 2014).

### 3.3. Trasmissione

I fitoplasmi sono patogeni privi di parete e il loro habitat è confinato agli ambienti isotonici di conseguenza, non è possibile trasmetterli meccanicamente. La loro trasmissione può avvenire mediante insetti vettori, innesto, propagazione vegetativa, micropropagazione e piante parassite come la cuscuta (Marcone, 2014). Per alcuni fitoplasmi è stata dimostrata la trasmissione attraverso il seme (Calari *et al.*, 2011; Satta 2017; Satta *et al.*, 2017). Le cellule dei fitoplasmi, attraverso le strutture fiorali, sono in grado infatti di infettare i semi anche a livello dell'embrione, portando alla produzione di plantule malate. La trasmissione via seme è stata dimostrata per semi di erba medica provenienti dall'Oman (Khan *et al.*, 2002); per "aster yellows" e "stolbur" in diverse colture erbacee: *Brassica napus*, *Solanum lycopersicum*, *Zea mays* e *Sesamun indicum* (Calari *et al.*, 2011; Satta 2017; Satta *et al.*, 2017), e in Repubblica Ceca per il fitoplasma "European stone fruit yellows" in piante di *Prunus armeniaca* e *Prunus persicae* (Nečas *et al.*, 2008).

Tuttavia il metodo di trasmissione dei fitoplasmi più studiato è quello che vede l'azione di insetti vettori, appartenenti alla famiglie Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae e Derbidae (ordine Emitteri) (Weintraub & Beanland, 2006). L'insetto dopo le fasi di acquisizione e latenza è in grado di trasmettere il patogeno attraverso le punture trofiche (fase di inoculazione). Si tratta di insetti floemomizi che tramite lo stiletto attraversano gli strati parenchimatici delle foglie per arrivare al floema e, nutrendosi della linfa, acquisiscono o trasmettono le cellule dei fitoplasmi. Una volta che i fitoplasmi vengono a trovarsi all'interno del lume intestinale dell'insetto, invadono le cellule dell'epitelio a spazzola e le adiacenti cellule muscolari, dove si suppone che si riproducano; da qui, essi vengono rilasciati nell'emolinfa (Özbek *et al.*, 2003; Ammar & Hogenout, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Una volta nell'emolinfa, i fitoplasmi invadono gli altri tessuti dell'insetto, comprese le ghiandole salivari. Quest'ultime sono composte da cellule con grandi vacuoli, nei quali si accumulano molecole che vengono rilasciate nel floema quando l'insetto si nutre (Fletcher *et al.*, 1998). È stato osservato che i fitoplasmi si localizzano e si accumulano in questi vacuoli (Weintraub *et al.*, 2006) ed in questo modo essi possono avere nuovamente accesso ai tessuti cribrosi di un'altra pianta una volta che l'insetto si nutra su di essa. I fitoplasmi possono svernare sia negli insetti sia in diverse piante perenni interagendo fortemente con il proprio ospite; studi condotti su differenti insetti vettori hanno evidenziato come la presenza di questi patogeni, al

loro interno, sia in grado di ridurre o migliorarne la "fitness" (Beanland *et al.*, 2000; Ammar *et al.*, 2006; Weintraub *et al.*, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Il risultato dell'interazione tra il fitoplasma e l'insetto vettore, e quindi anche quella tra pianta e fitoplasma, spesso riflette da quanto tempo i due organismi sono entrati in relazione: lunghe coevoluzioni portano a probabili interazioni di tipo neutro e/o positivo fra ospite e batterio. In alcune combinazioni è stata dimostrata la presenza di trasmissione transovarica: *Scaphoideus titanus*/ "aster yellows" (Danielli *et al.*, 1996; Alma *et al.*, 1997); *Hishimonoides sellatiformis* / 'mulberry dwarf' (Kawakita *et al.*, 2000); *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) / 'sugarcane white leaf' (Hanboonsong *et al.*, 2002); *Cacopsylla melanoneura* / 'plum' (Tedeschi *et al.*, 2006); *Cacopsylla picta* / "apple proliferation" (Mittelberger *et al.*, 2017). La relazione che intercorre tra il fitoplasma e il suo vettore varia notevolmente in base all'identità dei due organismi coinvolti; alcuni fitoplasmi presentano una bassa specificità per l'insetto vettore, e possono essere trasmessi da più di una specie, mentre in altri casi la relazione fitoplasma/vettore è estremamente specifica (Lee *et al.*, 1998b; Christensen *et al.*, 2004). Esempi particolari risultano 'Candidatus. Phytoplasma mali' (Kube *et al.*, 2008), che è estremamente specializzato nella colonizzazione del genere *Malus* spp., è veicolato da *Cacopsylla melanoneura* Foerster e *Fieberiella florii* e possiede il più ridotto genoma ad oggi sequenziato, mentre 'Ca. P. asteris', ha un largo spettro di piante ospiti ed è trasmesso da numerosi insetti vettori polifaghi (Tedeschi *et al.*, 2006b; Sugio & Hogenout, 2012). La relazione vettore-fitoplasma risulta molto stretta ed è influenzata notevolmente dal numero di insetti vettori e / o possibili piante ospiti. È stata identificata nei fitoplasmi una proteina antigenica di membrana (amp), in grado di interagire con il complesso di microfilamenti dei muscoli intestinali di alcuni insetti vettori e pertanto considerata coinvolta nelle trasmissioni specifiche di alcuni fitoplasmi (Suzuki *et al.*, 2006; Hoshi *et al.*, 2007).

### **3.4. Interazione con le piante ospiti**

Dal momento che i fitoplasmi vivono nel floema delle piante ospiti, il principale effetto della loro colonizzazione a carico dei tubi cribrosi è quello di modificarne struttura e funzioni. Diversi studi hanno dimostrato infatti che in piante infette da fitoplasmi si verifica un cambiamento nelle concentrazioni di carboidrati nel floema, nelle radici e nelle foglie, dovuto probabilmente ad un'alterazione del trasporto floematico dei soluti, che porterebbe ad

un accumulo di quantità anormali di questi composti, essenziali per l'accumulo di energia, nelle foglie mature e ad una riduzione della loro concentrazione nelle foglie giovani, nei fiori, nei frutti e nelle radici (Catlin *et al.*, 1975; Lepka *et al.*, 1999; Maust *et al.*, 2003). L'accumulo di zuccheri in foglie mature avrebbe come risultato finale l'inibizione della fotosintesi e quindi la comparsa dei tipici sintomi clorotici (Lepka *et al.*, 1999; Bertamini *et al.*, 2003; Maust *et al.*, 2003). Dal momento che piante infette presentano una sintomatologia varia, si è ipotizzato inoltre che l'infezione da fitoplasmi incida sulla concentrazione anche di altri composti, come i pigmenti fotosintetici e le proteine solubili (Bertamini & Nedunchezian, 2001; Musetti *et al.*, 2005), e alteri il bilancio ormonale e il trasporto degli amminoacidi (Jagoueix-Eveillard *et al.*, 2001; Maust *et al.*, 2003; Lepka *et al.*, 1999). Studi recenti hanno inoltre dimostrato che in piante di *Arabidopsis thaliana* infette, si verifica una parziale disorganizzazione del floema, con l'agglutinazione delle proteine e il loro successivo cambio conformazionale, e una deposizione di callosio che porta all'occlusione dei tubi cribrosi (Musetti *et al.*, 2013; Marco *et al.*, 2016). I meccanismi con cui i fitoplasmi inducono sintomi specifici nelle piante malate e il motivo per cui avvengono reazioni metaboliche molto diverse nelle piante infette sono tuttavia ancora poco studiati. Studi recenti hanno dimostrato che le anomalie fiorali che si osservano nelle piante infette sono associate a modificazioni nella regolazione di alcuni dei geni chiave dello sviluppo del fiore, quali quelli appartenenti alle famiglie APETALA e SEPALLATA (Pracros *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2011; MacLean 2014). In piante di petunia infette da '*Ca. P. asteris*', ceppo OY-W, i livelli di espressione di diversi geni omeotici richiesti per lo sviluppo di organi, come PETUNIA FLOWERING GENE (PFG), *P. hybrida* GLOBOSA1 (PhGLO1) e FLORAL BINDING PROTEIN7 (FBP7), sono risultati significativamente ridotti in sepali, petali e pistilli, ma non in stami che si sono rivelati asintomatici. Inoltre, i livelli di espressione dei geni che sono noti per essere coinvolti nello sviluppo del fiore dal meristema, come TERMINATOR (TER), ABERRANT LEAF AND FLOWER (ALF) e DOUBLE TOP (DOT) risultavano significativamente ridotti nei meristemi di petunia infetti (Himeno *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013). Sono stati identificati diversi altri geni delle piante differenzialmente espressi a seguito di infezioni da fitoplasmi. Questi includono i geni coinvolti nella produzione di fitormoni, nella fotosintesi, nel metabolismo dei lipidi e dei carboidrati, nel trasporto di amminoacidi, nella biosintesi dei fenilpropanoidi e della parete cellulare e nelle risposte di

difesa a stress della pianta (Jagoueix-Eveillard *et al.*, 2001; Carginale *et al.*, 2004; Nicolaisen & Horvath, 2008; Albertazzi *et al.*, 2009; Hren *et al.*, 2009; Chen & Lin, 2011; De Luca *et al.*, 2011; Guerriero *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2013; Mou *et al.*, 2013). La disponibilità di sequenze complete del genoma dei fitoplasmi ha permesso inoltre di identificare un numero considerevole di geni che possono giocare ruoli importanti nelle interazioni con la pianta ospite. Tra questi, ci sono i geni che codificano proteine di membrana e proteine effettrici (Bai *et al.*, 2009; Hoshi *et al.*, 2009; MacLean *et al.*, 2011; Sugio *et al.*, 2011; Kube *et al.*, 2012). I fitoplasmi possiedono infatti geni che codificano per proteine effettrici che possono manipolare i processi delle cellule ospiti, generando cambiamenti nello sviluppo delle piante e traendone conseguentemente vantaggio per la loro moltiplicazione (Hogenhout *et al.*, 2009). Questi composti sono rilasciati nel citoplasma delle cellule ospiti attraverso i sistemi di secrezione SecA, SecE e SecY i quali sono stati descritti come funzionali anche nei fitoplasmi (Kakizawa *et al.*, 2004). Le proteine secrete possiedono solitamente un segnale terminale N' di circa 20 aminoacidi nella propria sequenza peptidica la quale viene riconosciuta e successivamente tagliata dal complesso di secrezione Sec (Rashid *et al.*, 2018). Gli effettori una volta secreti (es. SAP11 e SAP-54 dal fitoplasma AY-WB e TENGU da OY) si accumulano nei tessuti localizzati ad una certa distanza dalle cellule infettate, e giocano un ruolo chiave nelle interazioni pianta-patogeno, attivando specifiche risposte della pianta (Sugio *et al.*, 2011; McLean *et al.*, 2011; Hoshi *et al.*, 2009). Infatti, sebbene il fitoplasma sia confinato all'interno del floema, le proteine effettrici da esso secrete sono state rinvenute anche in altri tessuti dell'ospite come ad esempio le cellule parenchimatiche, i meristemi apicali e i germogli ascellari per quanto riguarda la proteina TENGU mentre in merito a SAP11 è stata evidenziata una prevalente localizzazione nucleare necessaria per esplicare la propria azione a livello dei nuclei cellulari (Hoshi *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2009). Le proteine vengono traslocate mediante le cellule cribrose per spostarsi successivamente tra le cellule dell'ospite. E' molto probabile che questi composti siano trasportati attraverso il plasmodesma, tessuto di connessione tra le varie cellule vegetali (Rashid *et al.*, 2018). Il limite di esclusione dimensionale (SEL) del plasmodesma che connette le cellule cribrose con le cellule compagne presenti nel floema è stato riportato essere più grande di 67 kDa mentre il SEL della maggior parte delle cellule vegetali varia generalmente da 10 a 50 kDa (Stadler *et al.*, 2005; Imlau *et al.*, 1999). Inoltre, il SEL dei plasmodesmi risulta differente tra

i tessuti “sink” e “source” della pianta presentando approssimativamente valori di circa 10 kDa nei tessuti “source” mentre valori di circa 50 kDa nei tessuti “sink” (Imlau *et al.*, 1999). Studi condotti da Bai *et al.*, 2009 hanno dimostrato come la maggior parte delle proteine effettrici generate dal ceppo AY-WB di ‘*Ca. P. asteris*’ risultino inferiori a 40 kDa supponendo quindi come la maggior parte di questi composti possano essere scaricati dal floema mediante i plasmodesmi prevalentemente nei tessuti “sink” della pianta (Hogenhout & Loria 2008). Questo concetto risulta in accordo con la tipica sintomatologia espressa dalle piante infette da fitoplasmosi le quali esprimono la maggior parte dei sintomi proprio nei tessuti “sink” quali germogli, meristemi e fiori (Rashid *et al.*, 2018). Nel genoma del ceppo AY-WB di ‘*Ca. P. asteris*’, sono stati individuati 56 geni che possono codificare proteine secrete (Bai *et al.*, 2009). Tra di esse, SAP11 contiene segnali di localizzazione nucleare eucariotica ed induce malformazioni fogliari e proliferazione dei germogli in piante transgeniche che la esprimono (Bai *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011). Studi condotti da Sugio *et al.*, 2011, 2014 hanno dimostrato come SAP11 interagisca con il fattore di trascrizione TCP alterandone la propria funzionalità; TCP esplica ruoli fondamentali nel controllo del ritmo circadiano, nella regolazione ormonale, nella biogenesi dei mitocondri e anche nella differenziazione e successiva proliferazione delle cellule. Questi processi risultano determinanti nello sviluppo dei gametofiti, nella germinazione dei semi e nella regolazione delle fasi vegetative e riproduttive degli organi vegetali. Il fattore di trascrizione TCP, in relazione al proprio dominio strutturale, è stato diviso in due classi (Martin-Trillo & Cubas 2010); SAP11 sembra esplicare la propria azione solamente sulle classi II del TCP incluse CINCINNATA (CIN) e CYC/TB1 generando una sovrapproduzione di cellule immature che portano alla formazione di foglie più larghe e accartocciate e di un maggior numero di germogli (Rashid *et al.*, 2018). Oltre a SAP11, si è visto che anche un’altra proteina, SAP54 può causare cambiamenti morfologici negli organi fiorali di *Arabidopsis thaliana*, inducendo sintomi simili a quelli osservati in piante infette da fitoplasmi (MacLean *et al.*, 2011). Ad oggi oltre ai 56 probabili effettori rinvenuti nel ceppo AY-WB denominati “secreted AY-WB proteins” (SAPs) ne sono stati individuati 45 nel ceppo OY-M (‘*Ca. P. asteris*’), 41 in AUSGY (‘*Ca. P. australiense*’), 13 in AP (‘*Ca. P. mali*’), 25 in MBS (‘*Ca. P. asteris*’) (Bai *et al.*, 2009; Orlovskis *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000). Sebbene i meccanismi molecolari rimangano tuttora sconosciuti, si presume che queste proteine secrete

dai fitoplasmi possano interferire con la funzione dei geni coinvolti nello sviluppo dei fiori (Sugio & Hogenhout, 2012). Tra le altre sequenze potenzialmente codificanti proteine secrete individuate nel genoma di '*Ca. P. asteris*', ceppo OY-M, TENGU è stata segnalata in quanto in grado di indurre sintomi simili all'infezione da fitoplasma in piante transgeniche (Hoshi *et al.*, 2009; Sugawara *et al.*, 2013). TENGU codifica una proteina molto piccola (4.5 kDa), la cui forma matura, dopo la scissione del peptide segnale N-terminale, ha solo 38 aminoacidi. Le analisi con "microarray" hanno rivelato che l'espressione di molti geni correlati all'auxina erano significativamente sotto-regolati in piante transgeniche per TENGU, suggerendo la capacità di tale proteina di sopprimere i meccanismi di segnale dell'auxina o la sua biosintesi (Hoshi *et al.*, 2009; Denancé *et al.*, 2013). Considerato il fatto che diversi studi hanno evidenziato una remissione dei sintomi associati a fitoplasmosi in piante di vinca coltivate su substrati contenenti un'elevata concentrazione di auxina (Pertot *et al.*, 1998; Curkovic Perica *et al.*, 2007), si è ipotizzato che questo ormone possa avere un grande impatto sull'interazione pianta-fitoplasma. I sintomi delle malattie associate a fitoplasmi sembrano poter anche essere causati dagli effetti collaterali dell'infezione (effetti indiretti), come il consumo di metaboliti. Questa idea era parzialmente supportata dall'assenza nel genoma dei fitoplasmi di molte vie metaboliche di sintesi (Oshima *et al.*, 2004; 2007). Tuttavia, l'identificazione di TENGU, SAP11 e SAP54 hanno modificato questa idea: il fitoplasma, infatti, potrebbe indurre in modo aggressivo la sintomatologia mediante secrezione di proteine effettrici e modifica dell'attività dei geni vegetali (Hoshi *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011; Himeno *et al.*, 2011). La presenza di una sintomatologia più o meno accentuata sembrerebbe inoltre legata al numero di sequenze ripetute di DNA (PMUs "potentials mobile units") presenti nel genoma dei fitoplasmi; suddetta caratteristica è stata ipotizzata essere correlata alla virulenza del ceppo fitoplasmatico (Bai *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2015).

### **3.5. Importanza economica delle fitoplasmosi**

Le infezioni da fitoplasmi risultano spesso mortali e causano ingenti danni alla produzione agricola. Esempio caratteristico è rappresentato dalle epidemie associate a fitoplasmi nelle palme da cocco ("palm lethal yellowing") le quali, portando a deperimento le piante, limitano i mezzi di sostentamento di molte persone sia in Africa che nei Caraibi; queste popolazioni infatti traggono beneficio da questi alberi sia per la loro alimentazione che per la loro

economia (Strauss, 2009). Durante gli anni '90, "peach yellows" e "X-disease" causarono pesanti perdite produttive nei pescheti e ciliegeti presenti nel territorio degli Stati Uniti d'America. Malattie associate alla presenza di fitoplasmi, come ad esempio il "lime witches' broom", hanno eliminato quasi totalmente la tradizionale produzione di lime in Iran e nel Sultanato dell'Oman; il nanismo giallo del riso ha colpito gravemente le colture di riso in più regioni dell'Asia sud-orientale; la malattia associata agli scopazzi della patata dolce ha causato ingenti perdite produttive in Asia e in Australia. Il deperimento del pero, gli scopazzi del melo, il giallume delle drupacee hanno recato gravi perdite sia produttive che qualitative alla frutticoltura europea (Bertaccini, 2007). Inoltre, studi condotti da Hogenhout *et al.*, 2008 prevedono un incremento di queste malattie nei prossimi anni come conseguenza del riscaldamento globale, fenomeno vantaggioso per tutti gli insetti vettori sensibili alle basse temperature. Tali problematiche non rappresentano una minaccia solamente per le coltivazioni o i luoghi in cui vengono rinvenute, esse infatti, attraverso il commercio internazionale, lo scambio del materiale vivaistico o l'introduzione accidentale di potenziali insetti vettori, possono diffondersi ovunque rappresentando un serio problema per l'agricoltura mondiale (Lee *et al.*, 2000).

### **3.6. Giallumi della vite**

I giallumi della vite ("grapevine yellows", GYs) rappresentano una delle malattie descritte in tutte le aree vitivinicole mondiali. Molte varietà, sia a bacca bianca che nera, risultano suscettibili alla malattia, in particolare Chardonnay e Riesling, mentre le varietà dei portinnesti risultano spesso asintomatiche (Borgo *et al.*, 2009; Constable, 2010). Indipendentemente dalla tipologia di fitoplasma presente nelle piante infette (Dermastia *et al.*, 2017) la sintomatologia causata da questi batteri rimane invariata manifestando tipicamente arrossamenti e arrotolamenti fogliari, lignificazioni anormali dei germogli, internodi corti e aborti fiorali. A livello mondiale le principali malattie in vite associate alla presenza di fitoplasmi e quindi denominate con l'acronimo GYs sono: flavescenza dorata, "Palatinate grapevine yellows" e legno nero, in Europa meridionale e nelle regioni mediterranee; "North American grapevine yellows", negli Stati Uniti e Canada; "Australian grapevine yellows" e "Buckland valley grapevine yellows" in Australia, ed infine altri giallumi della vite associati a diversi fitoplasmi, riportati in Cile e Sudafrica (Weintraub &

Jones 2010; Angelini *et al.*, 2018). Nonostante tutte queste malattie siano accumulate da una sintomatologia simile, le analisi molecolari hanno permesso di individuare fitoplasmici appartenenti a gruppi ribosomici distinti. I principali GYs in Europa sono flavescenza dorata (FD, patogeno da quarantena in Europa, sottogruppi ribosomici 16SrV-C / D) (Bertaccini *et al.*, 1995; Martini *et al.*, 1999) e legno nero (BN, ‘*Ca. P. solani*’, 16SrXII-A) (Quaglino *et al.*, 2013), trasmessi rispettivamente dal vettore ampelofago monovoltino *Scaphoideus titanus* Ball e dal cixide polifago *Hyalestes obsoletus* Signoret (Schvester *et al.*, 1961; Sforza *et al.*, 1998). Prima della messa a punto di metodi diagnostici molecolari, la differenziazione dei fitoplasmici associati a GYs era basata sulle loro caratteristiche biologiche, come la specificità del vettore (Caudwell, 1990). Grazie al perfezionarsi delle tecniche molecolari, tuttavia, e all’analisi delle sequenze e dei profili RFLP, si è riusciti a identificare ben 24 differenti sottogruppi di fitoplasmici, appartenenti a 12 gruppi ribosomici, associati a GYs nel mondo, alcuni segnalati solo recentemente in nuovi areali di produzione viticola (Tabella 2).

<b>Gruppo/ sottogruppo ribosomico</b>	<b>Ceppo tipo</b>	<b>Segnalati in</b>
16SrI-A	“Tomato big bud”	Canada, USA (Davis <i>et al.</i> , 1998; Olivier <i>et al.</i> , 2009)
16SrI-B	“Aster yellows”	Canada, Cile, Croazia, Italia, Slovenia, Sud Africa, Tunisia, Turchia (Alma <i>et al.</i> , 1996; Lee <i>et al.</i> , 2004; Gajardo <i>et al.</i> , 2009; Engelbrecht <i>et al.</i> , 2010; Mhirsi <i>et al.</i> , 2004; Canik <i>et al.</i> , 2011; Sarik <i>et al.</i> , 1997; Seruga <i>et al.</i> , 2002)
16SrI-C	“Clover phyllody”	Italia, Canada, Cile (Gajardo <i>et al.</i> , 2009; Alma <i>et al.</i> , 1996; Fiore <i>et al.</i> , 2007)
16SrII-B	“grapevine yellows”	Iran (Zamharir <i>et al.</i> , 2017)
16SrII-D	“Peanut witches’ broom”	Australia (Gibb <i>et al.</i> , 1999)
16SrIII	“X-disease”	Italia, Croazia, Israele (Prince <i>et al.</i> , 1993; Jezic <i>et al.</i> , 2013; Tanne & Orenstein 1997)
16SrIII-A 16SrIII-I 16SrIII $\alpha$ -16SrIII $\beta$	“Virginia grapevine yellows”	USA, Canada (Davis <i>et al.</i> , 1998; 2005)
16SrIII-J	“Chayote witches’ broom”	Cile, Brasile (Fiore <i>et al.</i> , 2015; Dos Santos <i>et al.</i> , 2015)
16SrV-A	“Elm yellows”	Italia, Cile (Pisi <i>et al.</i> , 1981; Fiore <i>et al.</i> , 2015)
16SrV-C	“Flavescence dorée”	Italia, Austria, Croazia, Francia, Ungheria, Romania, Spagna, Serbia, Slovenia, Svizzera

		(Martini <i>et al.</i> , 1999; Caudwell <i>et al.</i> , 1990; Seljak 2008; Duduk <i>et al.</i> , 2003; Reisenzein & Steffek 2011; Irimia <i>et al.</i> , 2010; Music <i>et al.</i> , 2011; Kriston <i>et al.</i> , 2013; Torres <i>et al.</i> , 2005; Jermini <i>et al.</i> , 2008)
16SrV-D	“Flavescence dorée”	Italia, Francia, Spagna, Portogallo (Martini <i>et al.</i> , 1999; Battle <i>et al.</i> , 1997; Sousa <i>et al.</i> , 2010)
16SrVI	“Clover phyllody”	Italia, Siria (Zambon <i>et al.</i> , 2018; Contaldo <i>et al.</i> , 2011)
16SrVII-A	“Ash yellows”	Italia, Cile, Iran (Gajardo <i>et al.</i> , 2009; Zambon <i>et al.</i> , 2018; Zamharir <i>et al.</i> , 2017)
16SrIX		Turchia, Iran (Canik <i>et al.</i> , 2011; Zamharir <i>et al.</i> , 2017)
16SrIX-C	“Shiraz grapevine yellows”	Iran, Libano (Casati <i>et al.</i> , 2006; Salehi <i>et al.</i> , 2006)
16SrX-A	“Apple proliferation”	Italia (Bertaccini <i>et al.</i> , 1996)
16SrX-B	“European stone fruit yellows”	Italia, Ungheria, Serbia (Bertaccini <i>et al.</i> , 1996; Varga <i>et al.</i> , 2000, Duduk <i>et al.</i> , 2004)
16SrXII-A	“Bois noir”	Europa, Cile, Iran, Israele, Libano, Turchia, Canada, Azerbaijan, Giordania, Moldova, Cina, Sud Africa (Quaglino <i>et al.</i> , 2013; Davis <i>et al.</i> , 1997; Gajardo <i>et al.</i> , 2009; Ertunc <i>et al.</i> , 2015; Choueri <i>et al.</i> , 2002; Karimi <i>et al.</i> , 2009; Rott <i>et al.</i> , 2007; Salem <i>et al.</i> , 2013; Balakishiyeva <i>et al.</i> , 2016; Bondarciuc <i>et al.</i> , 2018; Duduk <i>et al.</i> , 2010; Botti & Bertaccini, 2006)
16SrXII-B	“Australian grapevine yellows”	Australia (Padovan <i>et al.</i> , 1995; Davis <i>et al.</i> , 1997b)
16SrXV	“grapevine yellows”	Perù (Wei <i>et al.</i> , 2017)
16SrXXIII-A	“Buckland valley grapevine yellows”	Australia (Constable <i>et al.</i> , 2002)
16SrXXIX	‘Ca. P. omanense’	Libano (Foissac <i>et al.</i> , 2018)

**Tabella 2.** Elenco dei principali fitoplasmi identificati in vite nel mondo (modificato da Dermastia *et al.*, 2017).

Sicuramente rilevante nel determinare la diffusione dei giallumi è il ruolo degli insetti vettori, i quali nutrendosi dal floema di piante infette permettono alle cellule fitoplasmatiche di invadere i propri tessuti; esse successivamente attraversando l'epitelio intestinale e la lamina basale raggiungono l'emolinfa ove si moltiplicano per poi colonizzare le ghiandole salivari ed essere nuovamente trasmesse durante una successiva nutrizione. Le strategie di controllo dei fitoplasmi della vite in Europa sono principalmente dirette al controllo di FD e si basano su

prevenzione, indagini e trattamenti con insetticidi contro l'insetto vettore *S. titanus*, tuttavia, altri insetti possono giocare un ruolo nella trasmissione di questi batteri fitopatogeni. È stato dimostrato infatti che *Dictyophara europaea* (L.) (Hemiptera Dictyopharidae) trasmette fitoplasmi da *Clematis vitalba* L. a viti in condizioni sperimentali (Filippin *et al.*, 2009), e *Oncopsis alni* (Schrank) (Cicadellidae; Macropsinae) può trasmettere 16SrV-C da ontano a vite, inducendo il giallume della vite del Palatinato (PGY) (Maixner *et al.*, 2000). Il monitoraggio delle specie di insetti che sono particolarmente abbondanti nei vigneti e che potrebbero fungere da nuovi vettori potenziali è quindi molto rilevante anche nella gestione dei giallumi. Recentemente, *Orientus ishidae* (Matsumura) (Cicadellidae, Deltocephalinae) è risultato positivo a fitoplasmi 16SrV-C e -D in Slovenia, Italia e Svizzera (Gaffuri *et al.*, 2011, Mehle *et al.*, 2010; 2011; Trivellone *et al.* 2015) e 16SrVII-A in Italia (Zambon *et al.*, 2018) ed è stato anche dimostrato capace di trasmettere i fitoplasmi del gruppo ribosomico 16SrV da fava a vite (Lessio *et al.*, 2016). L'epidemiologia dei giallumi risulta molto complessa considerando che i fitoplasmi coinvolti nello sviluppo della malattia possono essere molteplici, come anche le numerose piante ospiti secondarie. In Europa i fitoplasmi 16SrV-C sono stati rilevati infatti in diverse specie infestanti come *Clematis vitalba*, *Alnus glutinosa*, *Sambucus nigra*, *Cornus sanguinosa*, *Prunus spinosa*, *Ulmus glabra*, *Ulmus minor*, *Ulmus* ssp., *Corylus avellana* e *Salix* sp. (Maixner *et al.*, 2000; Angelini *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2005; Casati *et al.*, 2017). D'altra parte, i fitoplasmi "stolbur" (16SrXII-A) sono stati segnalati in una vasta gamma di colture e piante selvatiche tra cui solanacee, lavanda, fragola, barbabietola da zucchero, ortiche urticanti (*Urtica dioica*) e convolvolo (*Convolvulus arvensis*) (Borgo *et al.*, 2008; Lessio *et al.*, 2007; Maixner *et al.*, 1995; Marcone *et al.*, 1997; Škoric *et al.*, 1998).

### **3.6.1. Metodi di controllo dei giallumi della vite**

Il controllo dei giallumi della vite è basato principalmente su azioni di contenimento e controllo della malattia, primo fra tutti il controllo del materiale di propagazione secondo le regole di quarantena dei vari Paesi coinvolti. Le piante infette non possono essere curate e il controllo della malattia avviene con la distruzione delle piante colpite, i trattamenti insetticidi contro gli insetti vettori e l'uso di materiale per la propagazione sano. L'aspetto pratico più importante risulta quello di conoscere i vettori di fitoplasmi in un determinato ecosistema

allo scopo di poter effettuare trattamenti insetticidi mirati nei momenti dell'anno in cui la popolazione dell'insetto evidenzia il suo picco massimo (Mori *et al.*, 2008). Questo approccio riduce i costi materiali e di lavoro ed in contemporanea l'impatto ambientale. La propagazione della malattia dipende dall'abbondanza dell'inoculo, è stata infatti dimostrata una correlazione tra la concentrazione di FD nella pianta e l'efficienza di acquisizione da parte di *S. titanus* (Galetto *et al.*, 2014). Anche la dimensione della popolazione degli insetti (Morone *et al.*, 2007) e la loro efficienza di trasmissione hanno un ruolo epidemiologico rilevante. Una possibile strategia per il controllo della malattia potrebbe essere la messa a dimora di portinnesti e cultivar di vite meno suscettibili a FD e / o alla sua moltiplicazione. Ad oggi però le prove fenotipiche e genetiche per tali caratteri risultano ancora molto scarse non consentendo di individuare varietà di portinnesto con queste caratteristiche. Il rischio di utilizzare varietà meno suscettibili alla malattia potrebbe però generare nel lungo periodo modificazioni genetiche nei ceppi di fitoplasmi, che come tutti i microorganismi sono portati ad adattarsi alla propria pianta ospite (Dermastia *et al.*, 2017). Il controllo di BN è considerevolmente più difficile e meno efficiente del controllo di FD a causa di un ciclo epidemico più complesso, che include piante ospiti alternative come fonti di inoculo e un vettore non-ampelofago (*Hyalestes obsoletus*) che vive prevalentemente su piante spontanee anche al di fuori del vigneto. Per BN inoltre, l'eliminazione delle viti sintomatiche non ha alcun effetto sulla sua diffusione in quanto la vite risulta "dead host" del vettore e non costituisce fonte di inoculo (Osler *et al.*, 1993). Un fenomeno interessante è il "recovery" ossia una remissione spontanea dei sintomi della malattia in piante precedentemente sintomatiche (Caudwell, 1961). In vite, questo fenomeno è stato osservato in diverse varietà e regioni viticole. Svariate indagini hanno dimostrato che la remissione dei sintomi può essere promossa esponendo la vite a stress abiotici, come ad esempio lo sradicamento seguito da trapianto immediato (Osler *et al.*, 1993), il parziale sradicamento o estrazione della pianta (Romanazzi & Murolo, 2008), oppure mediante pratiche agronomiche come la potatura e la spollonatura (Belli *et al.*, 2010). Sembra che il "recovery" possa essere collegato all'attività di particolari composti, come i metaboliti secondari; in particolare, nelle piante "risanate" sono state riscontrate una maggiore attività di NAD(P)H perossidasi delle membrane plasmatiche ed un aumento di acido jasmonico in concomitanza con una diminuzione dell'acido salicilico, a indicare un possibile legame tra questo fenomeno e la resistenza

sistemica acquisita (SAR) (Landi & Romanazzi, 2011; Musetti *et al.*, 2013; 2007; Patui *et al.*, 2013). SAR è una forma non specifica di resistenza alle malattie attivata dalle piante al riconoscimento di diversi elicitori. Questo processo è mediato dall'acido salicilico e sembra coinvolgere un insieme specifico di geni che codificano diverse proteine correlate alla patogenesi. Poiché non ci sono mezzi efficaci e diretti per ridurre l'incidenza di BN, un approccio promettente è consistito nello spruzzare la chioma vegetale con induttori di resistenza per migliorare il numero di piante con remissione dei sintomi. Risultati incoraggianti si sono ottenuti utilizzando il benzotiodiazolo (BTH), che induce resistenza ad un ampio spettro di patogeni in molte specie vegetali, e due composti contenenti glutazione e oligosaccaridine (Romanazzi *et al.*, 2013). Ulteriori strategie di difesa messe in atto per limitare le fitoplasmosi prevedono l'utilizzo di diverse comunità microbriche endofitiche come possibili agenti di biocontrollo. Gli endofiti sono microorganismi che vivono all'interno delle piante e possono promuoverne la crescita riducendo gli effetti deleteri dei patogeni. Funghi e batteri possono agire direttamente come antagonisti dei patogeni per il consumo di nutrienti e la produzione di sostanze allelochimiche o indirettamente inducendo meccanismi di resistenza sistemica ISR (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Negli ultimi anni molti studi si sono focalizzati sullo studio comparato degli endofiti in piante di vite sane, infette e "risanate", mostrando la presenza di 3 gruppi principali di batteri (*Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*) e suggerendo alcuni endofiti isolati in piante risanate come possibili agenti di biocontrollo (*Bulkholderia* sp., *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium*), (Bulgari *et al.*, 2011; 2012). I batteri endofitici che vivono nel floema vengono trasmessi dagli stessi insetti vettori di fitoplasmi e per questo motivo ne è studiato il rapporto con piante ospiti ed insetti vettori, per trovare dei ceppi utili. Uno di questi microorganismi è il batterio *Dyella-like* (DLB), isolato da *H. obsoletus* e che è stato dimostrato essere acquisito dall'insetto attraverso la suzione dal floema delle piante. Studi condotti da Iasur-Kruth *et al.*, 2018 su viti infette hanno dimostrato come questo batterio sia capace di moltiplicarsi all'interno della pianta riuscendo inoltre a ridurre i sintomi da GY. Ulteriori studi sono necessari affinché DLB possa essere realmente utilizzato come metodo di biocontrollo verso i principali fitoplasmi in vite.

## 4.0. IL PLASMA

### 4.1. Definizione ed origini

Il plasma, termine di origine greca avente come significato "cosa formata", viene considerato in fisica il quarto stato della materia in cui essa è totalmente decomposta in ioni. In natura rappresenta circa il 99% della materia visibile dell'universo come ad esempio il sole, le radiazioni e le luci polari (aurora boreale). Inizialmente descritto come "materia radiante" nel 1879 dal chimico inglese William Crookers venne successivamente denominato "plasma" dal fisico statunitense Irving Langmuir nel 1927; tale terminologia venne utilizzata per descriverne la propria natura descrivendolo come un certo volume di gas ionizzato essenzialmente privo di alcuna carica spaziale (Mott-Smith, 1971; Guy & Miles, 1974).

Il plasma è formato da una miscela di particelle pesanti (ioni, atomi, radicali liberi, molecole eccitate/non eccitate) e di particelle leggere (fotoni, elettroni) cariche elettricamente; queste molecole risultano in continuo movimento all'interno del gas a causa della presenza di diverse forze elettriche. Le elevate concentrazioni di cariche libere al suo interno rendono il plasma un buon conduttore elettrico fortemente sensibile ai campi elettromagnetici.

Il plasma viene generalmente ottenuto mediante l'utilizzo di scariche elettriche in quanto esso si forma grazie ad un trasferimento di energia al gas circolante. Le curve di Paschen (legge di Paschen) esprimono la tensione di innesco di un gas ionizzato (tensione di "breakdown", mediante la quale si genera il plasma) come funzione del prodotto tra pressione e lunghezza di un tubo di scarico rettilineo (distanza tra gli elettrodi). La curva presenta un livello minimo in funzione del gas utilizzato; durante la produzione del plasma si ha emissione di luce e proprio per questo generalmente si descrive il passaggio da scarica oscura a scarica a bagliore ("glow discharge"). Durante queste fasi si assiste alla produzione di cariche libere le quali riducono la resistenza elettrica e quindi la tensione esercitata alle estremità del tubo. Aumentando ulteriormente la tensione ai capi del tubo la scarica passa al regime di arco con conseguente aumento della luminosità e diminuzione della resistenza (Goldston & Rutherford, 1995; Lieberman & Lichtenberg, 2005; Petitpas *et al.*, 2007).

Molteplici sono i parametri utilizzabili per caratterizzare il plasma: il primo è la densità delle specie componenti (espressa in unità di misura  $1/m^3$ ), rappresentata dagli elettroni ( $n_e$ ), ioni ( $n_i$ ) e specie neutre ( $n_0$ ). Stabilita la densità delle specie è dunque possibile determinare il

grado di ionizzazione  $\alpha = n_i / (n_i + n_0)$  che ci permette di distinguere gas debolmente ionizzati, in cui  $\alpha$  tende a 0, gas altamente ionizzati in cui  $\alpha$  tende a 1 fino ad avere plasmi totalmente ionizzati se  $\alpha$  è pari a 1 (Chen *et al.*, 2006). Altro parametro fondamentale per caratterizzare il plasma è la temperatura determinata dall'energia media delle diverse specie presenti. L'energia del campo elettrico viene accumulata dagli elettroni lungo il loro cammino libero e, tramite le collisioni, trasferita alle particelle pesanti. Durante la collisione l'energia perduta dagli elettroni è relativamente piccola in rapporto alle masse in gioco. Con il susseguirsi delle collisioni tra elettroni e particelle pesanti le temperature medie delle diverse specie tendono ad eguagliarsi a meno di fenomeni particolari di raffreddamento.

Il plasma viene solitamente classificato in plasma termico e non termico in relazione ai propri livelli energetici relativi, alla temperatura ed alla densità elettronica (Moreau *et al.*, 2008; Nehra *et al.*, 2008; Petitpas *et al.*, 2007). I plasmi termici sono caratterizzati da una situazione di equilibrio tra elettroni, ioni e molecole neutre a differenza dei plasmi non termici ove, la presenza di gas veicolante ionizzato solo parzialmente (argon, elio, aria), determina un rapido raffreddamento degli ioni e delle molecole neutre le quali risulteranno più fredde rispetto a quelle presenti nei plasma termici (Nehra *et al.*, 2008). Il plasma non termico (NTP) viene generalmente prodotto a pressioni più basse generando una media energetica degli elettroni più elevata rispetto a quella delle specie pesanti; la situazione risultante è quindi molto lontana dall'equilibrio termodinamico riscontrato nel plasma atmosferico termico essendo caratterizzata da temperature multiple. In molti sistemi di plasmi non termici la temperatura degli elettroni è nell'ordine delle decine di migliaia di Kelvin mentre la temperatura del gas è prossima a quella ambiente. In natura l'esempio più concreto di plasma in equilibrio o termico è rappresentato dalla corona solare mentre l'aurora boreale può essere definita un plasma in non equilibrio termico. NTP può essere ottenuto mediante diversi sorgenti come ad esempio scarica a corona, scarica a barriera dielettrica (DBD), torcia APPJ (“atmospheric pressure plasma jet”), sistema a catodo cavo, arco conduttore di corrente o arco trasferito e scarica a bagliore atmosferico uniforme (Liu *et al.*, 1999; Nehra *et al.*, 2008).

## 4.2. Applicazioni dei plasmi atmosferici

Le caratteristiche dei plasmi atmosferici, tra cui la loro atmosfera fortemente reattiva, rende questa tecnologia molto interessante per svariate applicazioni pratiche. Trovano impiego nel trattamento superficiale dei materiali per vari scopi tra cui pulizia delle superfici, attivazione, erosione e funzionalizzazione (Tendero *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2011). Il trattamento permette la rimozione di contaminanti presenti nel substrato (oli, polveri, agenti chimici e biologici) e la degradazione dei composti organici. In ambito industriale i plasmi termici, soprattutto ad arco, vengono inoltre utilizzati per il taglio degli oggetti, la saldatura di componenti ed il trattamento di rifiuti tossici.

In campo ambientale l'applicazione delle scariche elettriche ha avuto un forte impatto fin dai primi sviluppi della tecnica; nel 1857 Siemens brevettò la scarica a barriera di dielettrico DBD, come generatore di ozono per la disinfezione dell'acqua (Siemens *et al.*, 1857). L'interesse crescente dell'opinione pubblica nei confronti delle tematiche ambientali e dell'inquinamento ha generato, a partire dagli anni settanta del secolo scorso, un forte impulso all'utilizzo di queste tecnologie per applicazioni ambientali. Da allora sono stati effettuati numerosi studi volti a confrontare le differenti tipologie di scariche con i tradizionali metodi di rimozione catalitica degli inquinanti in termini di efficienza energetica (Kim *et al.*, 2004). Esempi applicativi sono rappresentati dalla rimozione di NO<sub>x</sub> e SO<sub>2</sub> da fonti stanziali (fumi dei camini industriali) e da fonti mobili (auto) e la decomposizione di idrocarburi e composti organici volatili presenti come inquinanti nell'aria. I primi passi reali nell'industrializzazione di tali processi sono stati compiuti negli anni novanta con l'impianto pilota dell'Enel a Marghera basato su scariche a corona pulsate (Dinelli *et al.*, 1990). Successivamente sono comparsi almeno una trentina di nuovi impianti localizzati prevalentemente in Giappone, Corea e Cina. Recentemente l'applicazione di plasma sta conquistando anche il campo della biologia e della medicina ove viene applicato per la sterilizzazione e biocompatibilizzazione di superfici, il trattamento diretto di tessuti vivi, la sterilizzazione e la cicatrizzazione delle ferite e la coagulazione sanguigna. Nell'ambito della sterilizzazione molti studi dimostrano che il trattamento mediante plasma atmosferico porta all'uccisione anche selettiva di batteri, spore, muffe ed altri patogeni. Svariati sono i fattori che determinano il grado di disinfezione e di sterilizzazione da questi microrganismi come le specie attive (radicali, ioni, atomi e molecole eccitate), radiazioni UV ed effetti termici. Negli

ultimi anni diversi ricercatori hanno evidenziato la possibilità di utilizzare il plasma anche in ambito agronomico sfruttandone le caratteristiche di inattivazione batterica verso importanti patogeni di interesse industriale (*Erwinia* spp.) (Moreau *et al.*, 2005; 2007). Ulteriori studi, condotti da Park *et al.* 2013 hanno valutato l'effetto del plasma sulla germinazione, i tassi di crescita e l'apporto nutrizionale di diverse specie vegetali. L'utilizzo di plasma è risultato inoltre un metodo efficace per la decontaminazione degli alimenti freschi, per migliorare la vitalità dei semi, per incrementare le rese di diverse specie vegetali e per il controllo dei patogeni delle sementi (Carvalho *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2014a; Moreau *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2014b).

### **4.3. Acqua attivata al plasma**

Il trattamento di liquidi, mediante plasmi atmosferici di non equilibrio, è stato ampiamente studiato allo scopo di indagare ed approfondire le loro caratteristiche in termini di degradazione dei composti chimici presenti in soluzione, applicazioni ambientali, produzione e dispersione di nanoparticelle ed applicazioni biologiche (Magureanu *et al.*, 2011; Akiyama *et al.*, 2007; Fabiani *et al.*, 2013; Ikawa *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2015); queste proprietà sono attribuibili all'effetto del plasma il quale, generando radiazioni UV e radicali liberi, induce nel liquido differenti reazioni chimiche (Bruggeman *et al.*, 2009; Samukawa *et al.*, 2012).

Park *et al.* (2013) e Laurita *et al.* (2015) hanno sperimentato l'applicazione di plasma atmosferico non termico ad acqua sterile deionizzata (SDW); la soluzione così ottenuta, denominata acqua attivata al plasma ("Plasma activated water", PAW) evidenzia ottime proprietà antimicrobiche dovute essenzialmente all'effetto sinergico dei composti generati durante il trattamento ossia nitriti ( $\text{NO}_2$ ) e perossidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e alla contemporanea diminuzione del pH della soluzione (Kangang-Youbi *et al.*, 2007; 2008). Il trattamento al plasma modifica dunque le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua generando una soluzione caratterizzata da spiccata acidità (pH 2.3), elevata conduttività ed inducendo al suo interno la formazione di nitrati ( $\text{NO}_3$ ), nitriti ( $\text{NO}_2$ ) (specie reattive dell'azoto; RNS), radicali superossido ( $\text{O}_2\bullet$ ), perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicali idrossido ( $\bullet\text{OH}$ ) (specie reattive dell'ossigeno; ROS) (Laurita *et al.*, 2015). Analizzando le concentrazioni di questi composti durante il trattamento è stato possibile definire come  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{NO}_3$  tendano ad aumentare in funzione della durata dell'esposizione mentre  $\text{NO}_2$ , dopo una prima fase di accumulo, diminuisca; questo

comportamento è dovuto alle reazioni tra perossidi e nitriti le quali, in ambiente acido, portano alla formazione di perossinitrito (Laurita *et al.*, 2015). Nei momenti successivi al trattamento le concentrazioni di perossido di idrogeno e nitrati rimangono stabili mentre quelle dei nitriti, dopo 25 minuti, tendono a zero (Laurita *et al.*, 2015).

L'attività antimicrobica dei perossinitriti è stata dimostrata per svariati patogeni (Heaselgrave *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 1992): questi composti attraversano la membrana cellulare e danneggiano proteine, membrane fosfolipidiche, DNA inibendo inoltre la catena di trasporto degli elettroni (Ducrocq *et al.*, 1999). PAW presenta dunque attività antimicrobica diretta nelle prime fasi (10-25 minuti) ossia finché la presenza di nitriti, reagendo con i perossidi, consente la formazione di perossinitriti (Laurita *et al.*, 2015). Nel corso degli ultimi anni l'acqua attivata al plasma è stata impiegata per verificarne l'efficacia diretta contro batteri e funghi (Park *et al.*, 2013; Laurita *et al.*, 2015) e per la sua capacità di indurre l'espressione di geni di resistenza in pomodoro (Jiang *et al.*, 2014; Perez, 2016).

## SCOPO DELLA TESI

---

La presente ricerca ha avuto l'obiettivo di sperimentare l'utilizzo di acqua attivata al plasma (PAW) come possibile induttore di resistenza in pianta. La presenza in soluzione acida di forme reattive dell'ossigeno e dell'azoto quali  $H_2O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  una volta a contatto con i tessuti vegetali delle piante potrebbero elicitare l'attivazione di determinati "pathway" connessi al loro metabolismo secondario stimolando la produzione di importanti composti antimicrobici. Allo scopo di implementare il più possibile le nozioni inerenti l'effetto di PAW in pianta sono state eseguite diverse prove sia su piante sane sia su piante affette da malattie connesse alla presenza di fitoplasmi. Queste malattie, data l'impossibilità di impiegare gli antibiotici in agricoltura e la mancanza di efficaci strategie di difesa, risultano tutt'oggi di difficile contenimento e proprio per questo motivo si è voluta testare su di esse la possibile attività di PAW. Studi di espressione genica sono stati condotti sia in piante di *C. roseus in vitro* sia in piante di vite cv. Chardonnay *in vivo* allo scopo di determinare possibili reazioni nelle piante a seguito di trattamento con PAW. Inoltre, sono state studiate ed analizzate le popolazioni di miRNA in piante sottoposte/non sottoposte a trattamento con PAW e in piante infette/non infette da fitoplasmosi con l'obiettivo di chiarire da una parte i reali effetti del trattamento e dall'altra i fenomeni di interazione tra pianta e fitoplasma.

Infine, volendo fornire un'idea reale dell'applicabilità e dell'effetto di PAW in campo è stata condotta una prova poliennale in 17 vigneti ubicati nella zona di produzione del Conegliano Valdobbiadene DOCG (Regione Veneto) ove sono stati eseguiti, in viti sane e infette da fitoplasmi, trattamenti endoterapici con PAW con l'obiettivo di verificarne i possibili effetti sulla gestione di queste complesse malattie.

## CAPITOLO 1

### Effetti del trattamento PAW in vinche micropropagate

#### 1. MATERIALI E METODI

##### 1.1. Acqua attivata al plasma

L'acqua attivata al plasma utilizzata è stata ottenuta mediante scarica a barriera dielettrica (DBD, “dielectric barrier discharge”), secondo il metodo di Laurita *et al.*, (2015).

La sorgente DBD (Figura 5) è costituita da un contenitore circolare (94 mm di diametro esterno) di vetro borosilicato, che funge sia da recipiente del liquido che da barriera dielettrica (2 mm di spessore). Il liquido è trattato in atmosfera chiusa senza ricircolo d'aria; il volume del reattore, non occupato dall'acqua, viene riempito di aria ambiente che funge da gas vettore del plasma. Due fogli di alluminio, posti ai poli esterni della capsula, fungono da elettrodi; quello a contatto con il liquido (89 mm di diametro) è connesso ad un generatore di alto voltaggio pulsato al nanosecondo, mentre l'elettrodo a contatto con il gas (80 mm) è portato a terra. Il generatore produce impulsi ad alto voltaggio con bassa velocità (pochi kV/ns) e 50 mJ di energia a impulso. L'acqua trattata con plasma utilizzata in questo esperimento è stata ottenuta applicando una tensione di picco di 20 kV con una frequenza di ripetizione di 1 kHz, un vuoto d'aria di 1 mm e 80 mL di H<sub>2</sub>O distillata (SDW). Con questa sorgente, a partire da acqua distillata, in 10 minuti vengono prodotti 80 ml di PAW.

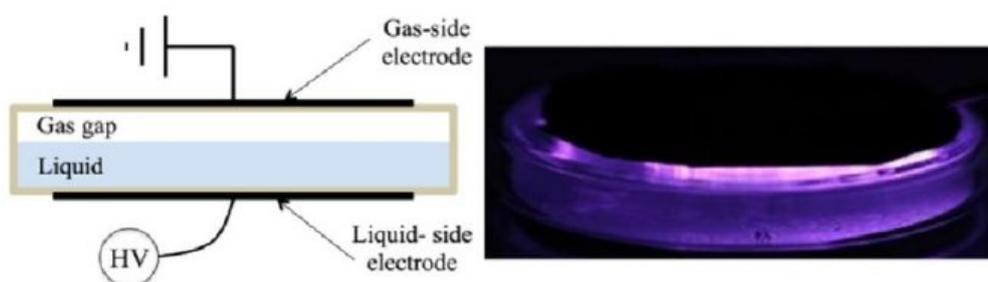


Figura 5. Schema e fotografia della sorgente DBD (da Laurita *et al.*, 2015).

Soluzione	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mM]	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mM]	pH
PAW	0,2	2,4	0	2,5

**Tabella 3.** Profilo chimico della soluzione PAW

La concentrazione dei principali RONS ed il pH della soluzione prodotta è stata misurata con un metodo semiquantitativo impiegando “strip” analitiche Quantofix® che presentano un settore di carta nella parte inferiore contenente un reagente specifico. Questo settore è stato immerso nella soluzione PAW ed ha assunto una colorazione tanto più intensa tanto più era alta la concentrazione di specie reattive in soluzione. Attraverso il confronto di tale settore colorato con una tabella di calibrazione è stato possibile quantificare i RONS (Tabella 3).

## 1.2. Preparazione del materiale vegetale

Allo scopo di eseguire la sperimentazione su un numero di piante con identico patrimonio genetico, sono state selezionate 30 piante di *Catharanthus roseus* (L.) G. Don sane e 40 piante, della medesima specie, infette con il fitoplasma *hydrangea* 35 (16SrI-B), mantenute precedentemente in micropropagazione (Bertaccini, 2014). Per verificare la presenza del fitoplasma nelle piante selezionate si è proceduto all'estrazione del DNA mediante un protocollo cloroformio/fenolo (Prince *et al.*, 1993; appendice 1) seguita dall'analisi PCR mediante "primers" R16F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996) amplificanti un frammento di circa 1,200 nucleotidi del gene ribosomico 16Sr (appendice 2). Dai 70 germogli selezionati sono state micropropagate 186 nuove microtalee (102 infette - 84 sane) che sono state mantenute, sino al raggiungimento di una certa soglia di crescita (~10 cm), in ambiente controllato (24 ± 2°C, fotoperiodo di 16 h di luce) in un substrato specifico (Bertaccini *et al.*, 1992; appendice 3).

## 1.3. Valutazione della trascrizione dei geni di difesa

### 1.3.1. Trattamento e campionamento

I germogli di *C. roseus* micropropagati sono stati utilizzati per valutare e quantificare la trascrizione dei geni di resistenza selezionati. Allo scopo di verificare l'effetto del

trattamento con PAW, la sua azione è stata comparata con quella del fosetyl di alluminio [Aliette, Bayer Crop Science] (FoAl; controllo positivo), di acqua distillata (ddH<sub>2</sub>O; controllo negativo) e di controlli non trattati (utilizzati per la normalizzazione dei dati). Al raggiungimento della soglia di crescita di 10 cm, i germogli sono stati divisi in due gruppi; sani ed infetti con il fitoplasma. I germogli infetti erano 102 e sono stati suddivisi in 4 tesi costituite da 5 repliche biologiche per ciascuno dei 6 tempi analizzati. Gli 84 germogli sani sono stati suddivisi anch'essi in quattro tesi composte da 4 repliche biologiche per i sei tempi di analisi. Mediante questo approccio, in entrambi i gruppi, ogni tesi era composta da 6 serie di piante geneticamente identiche tra loro (Tabella 4).

Gruppo	Tesi	Molecole attive	Volume* (mL)	n° di piante per replica						Referenza
				T0	T1	T2	T3	T4	T5	
Infette	PAW	ROS; RNS	20	5	5	5	5	5	5	Gruppo-AlmaPlasma
	FoAl	Fosetyl all.	20	5	5	5	5	5	5	Bayer
	ddH <sub>2</sub> O	/	20	5	5	5	5	5	5	/
	NT	/	/	2	2	2	2	2	2	/
Sane	PAW	ROS; RNS	20	4	4	4	4	4	4	Gruppo-AlmaPlasma
	FoAl	Fosetyl all.	20	4	4	4	4	4	4	Bayer
	ddH <sub>2</sub> O	/	20	4	4	4	4	4	4	/
	NT	/	/	2	2	2	2	2	2	/

**Tabella 4.** Schema rappresentativo dell'esperimento; \* volume di soluzione utilizzato per singolo trattamento.

Il trattamento è stato eseguito sommergendo le piantine con le diverse soluzioni per 25 minuti ad eccezione dei controlli non trattati ove non è stato eseguito alcun trattamento (Figura 6). Il fosetyl di alluminio è stato utilizzato alla dose consigliata in etichetta pari a 2,5 g/l. Trascorsi i 25 minuti, in cui le piante sono rimaste esposte alle diverse soluzioni, il campionamento è stato eseguito prelevando la porzione apicale da ogni replica di ogni tesi a 0 (T0), 7 (T1), 24 (T2), 48 (T3), 96 (T4), 120 (T5) ore post-trattamento. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.



**Figura 6.** Germogli di *C. roseus* trattati per sommersione con PAW.

### **1.3.2. Estrazione di RNA**

L'RNA totale delle piante è stato estratto usando l'RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germania), seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. In particolare, per ciascun campione 100 mg di foglia sono stati dapprima macerati in azoto liquido e successivamente addizionati di tampone RTL (450  $\mu$ l). Il lisato è stato trasferito nella colonnina QIAshredder e centrifugato per 2 min a 10.000 rpm. Il liquido purificato attraverso la membrana in silice è stato trasferito in nuovo tubo Eppendorf ed addizionato di 0,5 volumi di etanolo 100%. L'intera soluzione trasferita nella colonnina "RNeasy spin column" posta in una nuova Eppendorf da 2 ml è stata centrifugata a 10.000 rpm per 15 secondi. Si è proceduto aggiungendo 350  $\mu$ l di tampone RW1 e procedendo con un'altra centrifugazione a 10.000 rpm allo scopo di lavare la membrana della colonnina. Dopo aver preparato la "DNase I incubation mix" contenente 10  $\mu$ l di DNase I stock solution e 70  $\mu$ l di tampone RDD ("RNase-Free DNase set"; Qiagen), 80  $\mu$ l di suddetta soluzione sono stati aggiunti ad ogni membrana lasciandole incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-30°C). Si è proceduto addizionando il tutto con 350  $\mu$ l di tampone RW1 e procedendo mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 1 minuto. Sono poi stati eseguiti due lavaggi mediante 500  $\mu$ l di tampone RPE e centrifugazioni di 15 secondi a 10.000 rpm. Infine, l'estratto di RNA è stato eluito in 50  $\mu$ l di acqua distillata sterile esente da nucleasi e conservato a -20°C.

### **1.3.3. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto**

Per determinare la quantità di RNA estratto ciascun campione è stato dapprima valutato mediante Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 Pro NanoQuant e successivamente anche mediante Spettrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), in cui 1 µl di RNA è stato letto e quantificato alla lunghezza d'onda di 260 nm. La qualità è stata valutata invece mediante corsa elettroforetica di 5 µl di RNA per ciascun campione in gel di agarosio 1% TAE [Tris-Acetato (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>) 1,04 M; EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 0,002 M], a 140 V per circa 1 ora. Nel gel è stato utilizzato il marker di RNA "RiboRuler Low Range ladder" (Thermo Scientific, Lituania) e la corsa, allo scopo di evitare la degradazione dell'RNA, è stata eseguita in ghiaccio. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato immerso in una soluzione 1% di bromuro di etidio per 10 minuti e successivamente trasferito in acqua distillata per altri 10 minuti eliminando il bromuro in eccesso. Infine, il gel è stato esposto alla luce di una lampada UV (312 NM) e fotografato con macchina fotografica Kodak EDAS 290.

### **1.3.4. Analisi qRT-PCR**

L'RNA estratto da ogni campione è stato sottoposto a retrotrascrizione allo scopo di ottenere il filamento di DNA complementare (cDNA). In particolare 250 ng di RNA totale sono stati incubati con 200 nM di "random primer" (Random Hexamer, Fermentas, Lituania) ed incubati 5 minuti a 70°C. Dopo un passaggio in ghiaccio, sono stati aggiunti 25 µl di una miscela di reazione contenente 17 µl di H<sub>2</sub>O, 5 µl di tampone [250 mM di Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 375 mM di KCl, 15 mM di MgCl<sub>2</sub> e 50 mM DTT], 0,27 µl di Ribolock (Fermentas, Lituania), 2,5 µl dNTPs 20 µM e 0,3 µl M-MLV RT (Promega, USA). Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per le successive amplificazioni mediante Real Time PCR ABI PRISM StepOnePlus<sup>™</sup> Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) con tecnica "syber green". Questo cromoforo, come l'etidio bromuro, emana fluorescenza ma risulta più sensibile e luminoso. Esso lega solo il doppio filamento di DNA; uno strumento calcola ad ogni ciclo la luminescenza emessa che di fatto rappresenta il numero di amplificati presenti nella reazione di PCR. Gli esperimenti sono stati condotti in piastre da 96 campioni; ogni singolo cDNA è stato analizzato 3 volte allo scopo di avere 3 repliche

tecniche per ciascuna analisi eseguita inoltre, per ogni gene sono stati caricati 3 pozzetti con la sola “master mix” come controllo interno. Per ogni piastra si procedeva caricando 45 pozzetti (15 campioni x 3 repliche tecniche) con la miscela contenente i "primers" per l'amplificazione del gene in esame e altri 45 con la miscela atta all'amplificazione del gene di controllo interno; il segnale ottenuto da quest'ultimo, espresso costantemente nei tessuti analizzati e non influenzato dai trattamenti sperimentali, veniva utilizzato per normalizzare il segnale emesso dai campioni in esame. Nell'esperimento in questione è stato selezionato come gene “target” l'ubiquitina (Tabella 5). Per ogni gene analizzato è stata usata la seguente miscela di amplificazione:

<b>Componente</b>	<b>Quantità (µl)</b>
cDNA (1:9)	3 µl
Syber green_er *	5 µl
Primer F (10µm)	0,1 µl
Primer R (10µm)	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	1,8 µl
<b>Totale</b>	<b>10 µl</b>

\* Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Per tutti i geni analizzati sono state utilizzate le seguenti condizioni di PCR:

50°C 2'  
 95°C 10'  
 95°C 15"  
 60°C 1' } x 40 cicli  
 aumento progressivo di 0,5° C ogni 30" da 60°C a 95°C

L'ultimo step del ciclo di qPCR mediante l'aumento progressivo della temperatura da 60°C a 95°C analizza la curva di "melting", permettendo di visualizzare le curve di dissociazione per ciascun frammento e di verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici.

### **1.3.5. Progettazione e validazione dei “primers” utilizzati**

Allo scopo di verificare possibili meccanismi di risposta al trattamento, sono stati individuati alcuni geni coinvolti nelle prime vie di segnalazione indotte da stress biotici e abiotici e nella via biosintetica degli alcaloidi. Per la progettazione dei "primer" utilizzati in qRT-PCR è

stato usato il programma Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) sulla base delle sequenze di riferimento elencate sotto.

Geni bersaglio	Numero di accesso GenBank
Fenilalanina ammonio liasi ( <i>CrPAL1</i> )	AB042520
Calcone sintasi ( <i>CrCHS</i> )	AJ131813
Strictosidina- $\beta$ -Glucosidasi ( <i>CrSGD</i> )	AF112888
Deacetilvindolina-O-acetiltransferasi ( <i>CrDAT</i> )	LN809931
Callosio sintasi ( <i>CrCalS11</i> )	HM800500
Ubiquitina ( <i>CrUBQ11</i> )	EU007433

**Tabella 5.** Geni selezionati per lo studio di espressione genica.

Per il disegno dei “primers” sono stati valutati diversi fattori:

- validità biochimica: per migliorare questo parametro si è cercato di posizionare all'estremità 3' del "primer" una G (guanina) oppure una C (citosina) evitando T (timina) e, per ciascun “primer”, è stato impostato un contenuto totale in G-C pari al 45-55%. E' stata poi attentamente valutata la temperatura di “melting” di ciascuna coppia di “primer” verificando che fosse possibilmente superiore a 55°C ed il più possibile simile. Per definire la temperatura di “melting” più idonea è stata utilizzata la cosiddetta regola del 4+2 :  $T_m = [(G/C \times 4^\circ C) + (A/T \times 2^\circ C)]$  tenendo come valori consigliati 72°C per la temperatura di “melting” e 68°C per la temperatura di “annealing”. Successivamente è stata valutata la autocomplementarità della sequenza di ciascun “primer” e la complementarità di sequenza tra i due “primers” in oggetto cercando di ridurre il più possibile entrambi i valori.

- validità biologica: allo scopo di verificare la specificità del “primer”, mediante il servizio blastin (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), sono state cercate eventuali omologie di sequenza nella stessa regione o all'interno del medesimo genoma.

I “primers” ottenuti sono stati controllati e successivamente selezionati mediante l'ausilio del programma Amplify 3 (Engels, 1993) che analizza l'omologia tra i “primers” ed il loro “target”, la lunghezza del trascritto risultante e la presenza di eventuali dimeri di “primers” o bande aspecifiche. In Tabella 6 sono riportati i “primers” utilizzati nell'analisi.

Gene	"Primer"	Sequenza 5'-3'	Amplificato	Bibliografia
<i>CrPAL1</i>	Forward	AAACCCGGCAATCCCTAACC	89	questo studio
	Reverse	GGAATTCGGCTCCCACATC		
<i>CrCHS</i>	Forward	ACTCCTCCGGCTACCTAC	84	questo studio
	Reverse	TCCTTGAGCACGTTGAGC		
<i>CrSGD</i>	Forward	TCACAAAGCTGCTGTGGAAG	182	Nejat <i>et al.</i> , 2012
	Reverse	CACCCGTTGTTAATGGCTCT		
<i>CrDAT</i>	Forward	CCTCCGGAAGCCATAGAAAAG	105	questo studio
	Reverse	CGTGGCACATCGACTGAGAA		
<i>CrCalS11</i>	Forward	GCTGCTTATGCGCTCGACTATG	201	Miotti, 2013
	Reverse	GTATCGTCTCTCGGCAACCCAC		
<i>CrUBQ11</i>	Forward	GGAAGGCATTCCACCAGACCA	131	Wei, 2010
	Reverse	TACCTCCCCGGAGACGAAGC		

**Tabella 6.** Sequenze dei "primers" utilizzati per l'amplificazione dei geni "target".

### 1.3.6. Analisi dei dati ottenuti mediante qRT-PCR

L'analisi dei dati di qPCR si basa sull'assunzione che tutti i campioni analizzati abbiano la stessa efficienza di PCR per uno specifico amplicone. Come dimostrato da Ramakers *et al.*, 2003 piccole variazioni nell'efficienza di PCR possono generare errate interpretazioni dei livelli di espressione. Per ovviare a questo problema l'efficienza di ogni singola coppia di "primers" è stata calcolata mediante il programma LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2013) che valuta la fluorescenza ad ogni ciclo per singolo campione. Questo valore si ottiene dalla linearizzazione della formula per le amplificazioni esponenziali di PCR utilizzando il logaritmo di entrambi i membri:  $\text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(\text{eff.}) \times C$ , dove  $N_c$  e  $C$  sono le misure dei dati di fluorescenza e il rispettivo numero dei cicli,  $\text{Log}(N_0)$  e  $\text{Log}(\text{eff.})$  rappresentano invece l'intercetta e l'inclinazione risultanti. L'efficienza ottenuta per ogni coppia di "primers", è stata utilizzata per calcolare i livelli differenziali di espressione genica tra le varie tesi. Le medie dei livelli di trascrizione di tutti i geni analizzati ( $C_t$ , "cycle threshold"), sono state normalizzate a quella rilevata per il gene di riferimento (ubiquitina). La trascrizione differenziale dei geni è stata determinata tramite il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001). I livelli di espressione di ogni singolo gene sono stati normalizzati basandosi sui controlli non trattati ad ogni singolo tempo di analisi. Infine, con l'obiettivo di valutare la presenza di differenze statisticamente significative tra le tesi analizzate, si è proceduto al calcolo dell'errore standard e tutti i dati sono stati elaborati mediante test "ANOVA one way" (Tukey's HSD,  $p=0,05$ ) e test "T-student" (Fisher, 1925).

## **2. RISULTATI**

### **2.1. Verifica della presenza di fitoplasmi nei germogli utilizzati**

L'analisi del gene ribosomico 16S dei fitoplasmi è stata eseguita su un totale di 70 germogli (40 infetti e 30 sani) di *C. roseus* utilizzati come materiale di partenza per le successive micropropagazioni. L'analisi ha confermato la positività della quasi totalità dei germogli infetti al fitoplasma Hydrangea 35 (16SrI-B) ad eccezione di 6, che sono stati sostituiti da altri 6, ove è stata accertata la presenza del fitoplasma. I germogli selezionati come sani hanno confermato la propria negatività alla presenza di fitoplasmi all'analisi "nested" PCR.

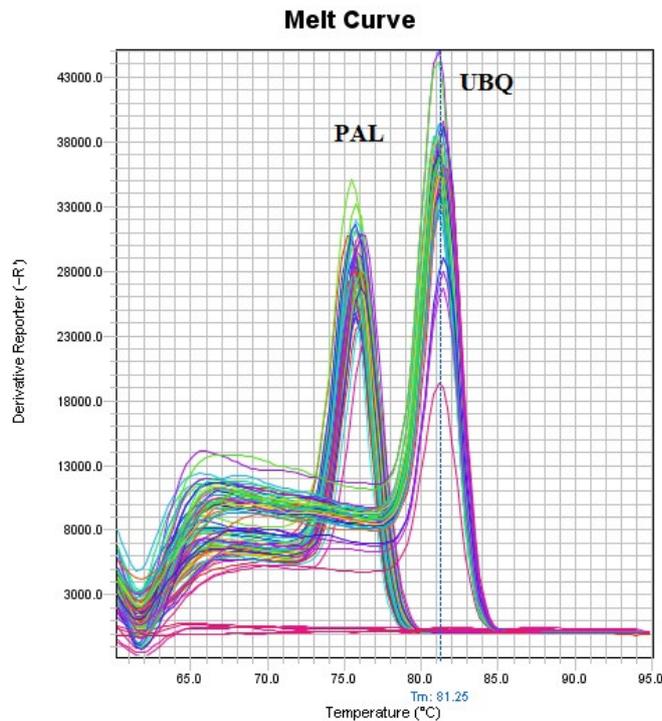
### **2.2. Estrazione degli acidi nucleici**

L' estrazione dell'RNA mediante kit commerciale ha consentito di ottenere buoni quantitativi di RNA da ogni singolo campione (concentrazione media ~ 320 ng/μl) con un rapporto di assorbanza sempre molto vicino a 2. I campioni che presentavano concentrazioni inferiori alla media o rapporti di assorbanza inferiori a 1.85 o superiori a 2.15, sono stati riestratti prima di essere sottoposti all'analisi. Anche la qualità degli acidi nucleici ha fornito ottimi risultati.

### **2.3. Analisi trascrizionale dei geni di difesa**

Il gene codificante l' ubiquitina, utilizzato come controllo interno, si è confermato un gene di riferimento affidabile evidenziando livelli di trascrizione equivalenti in tutte le tesi analizzate. I dati riportati di seguito evidenziano, per ogni singolo gene analizzato, le differenze riscontrate in termini di abbondanza dei livelli di trascrizione per ogni singola tesi ad ogni tempo di analisi. L'utilizzo di un controllo negativo, in questo caso della tesi trattata con acqua distillata sterile deionizzata, sottoposto alle stesse modalità di trattamento impiegate nelle altre due tesi (PAW, FoAl) ha permesso di valutare le reali risposte di difesa indotte nelle piante escludendo la possibilità che le differenze riscontrate potessero essere attribuite a fenomeni di stress indotti dalla sola sommersione in liquido. A tale scopo il controllo trattato con H<sub>2</sub>O è stato incluso negli studi di espressione genica in modo da garantire che i risultati ottenuti riflettessero accuratamente la risposta dell'ospite al solo

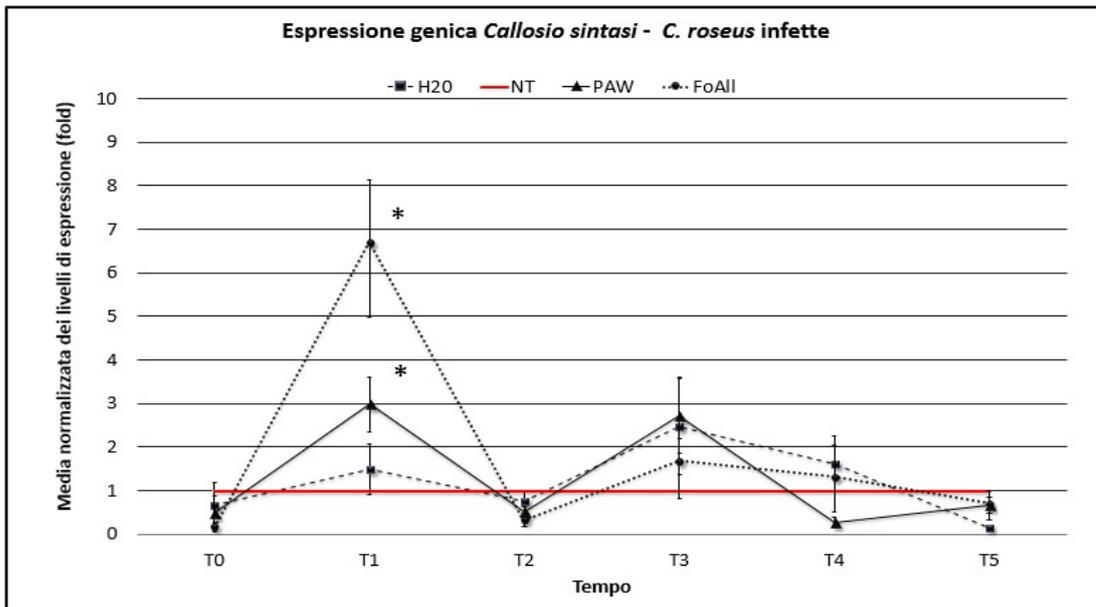
trattamento (Smart *et al.*, 2003). La specificità dei "primers" disegnati su ogni gene saggiato è stata verificata mediante curve di dissociazione (Figura 7).



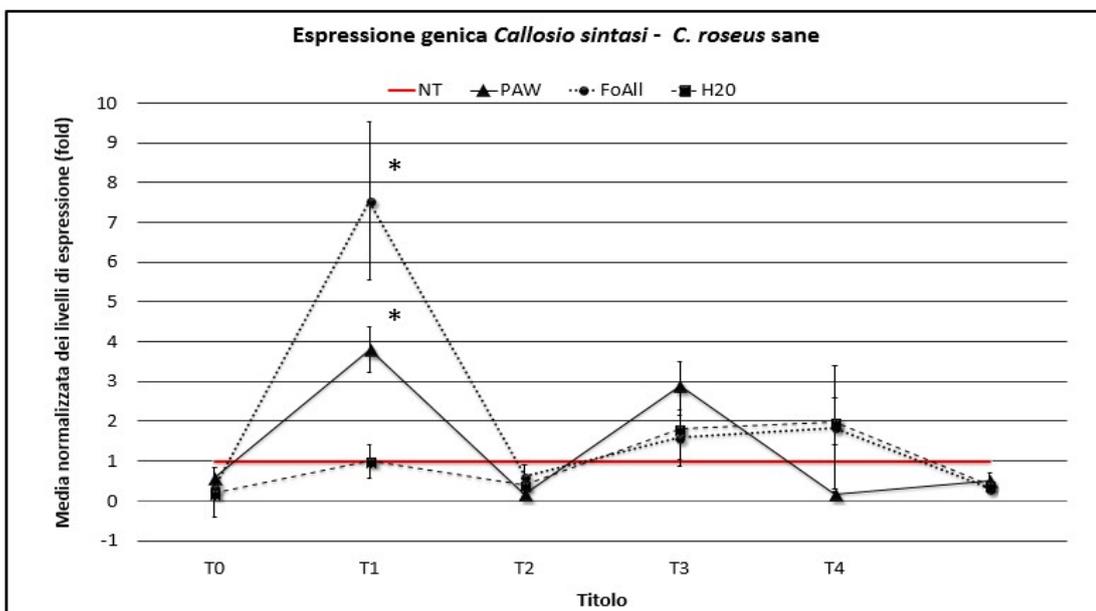
**Figura 7.** Curve di dissociazione ottenute dagli ampliconi prodotti da “primer” specifici per i geni ubiquitina (controllo interno; UBQ) e fenilalanina ammonio liasi (PAL).

### 2.3.1. Gene callosio sintasi

Dagli esperimenti di qRT-PCR si è potuto evidenziare come la sequenza omologa al callosio sintasi (*CrCalS11*) risulti modulata in maniera differenziale nelle varie tesi sottoposte ad analisi. Sia nei germogli infetti che sani, sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei livelli trascrizionali delle piante trattate con PAW e FoAl al tempo 1 [7 ore post-trattamento (p.t.)] rispetto alla tesi non trattata. In particolare a seguito del trattamento con FoAl è stato registrato, al tempo 1, un aumento della trascrizione del gene callosio sintasi paria a 6,7 e 7,5 volte la tesi non trattata rispettivamente nelle piante infette e nelle piante sane (Grafici 1 e 2). Comportamento analogo, sebbene con valori più bassi, è stato osservato anche nelle tesi trattate con PAW ove sono stati registrati livelli trascrizionali pari a 2,9 e 3,8 volte quelli della tesi non trattata rispettivamente nei germogli infetti ed in quelli sani (Grafici 1 e 2).



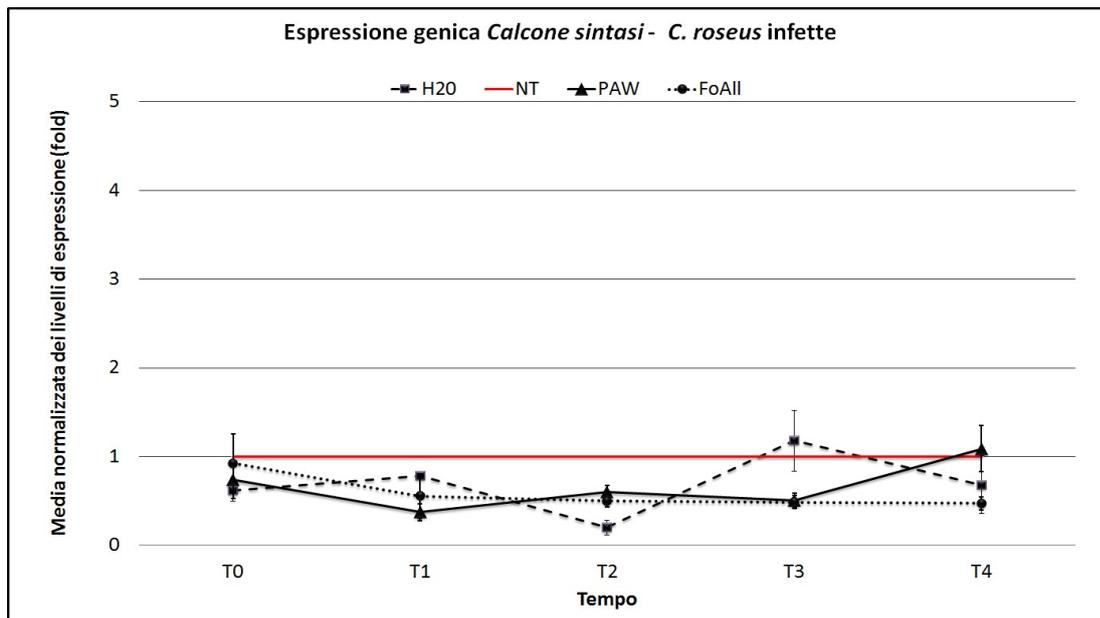
**Grafico 1.** Cinetica di espressione del gene *CrCalS11* in germogli di *C. roseus* infetti con fitoplasma Hydrangea 35 (16SrI-B) dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrCalS11* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)



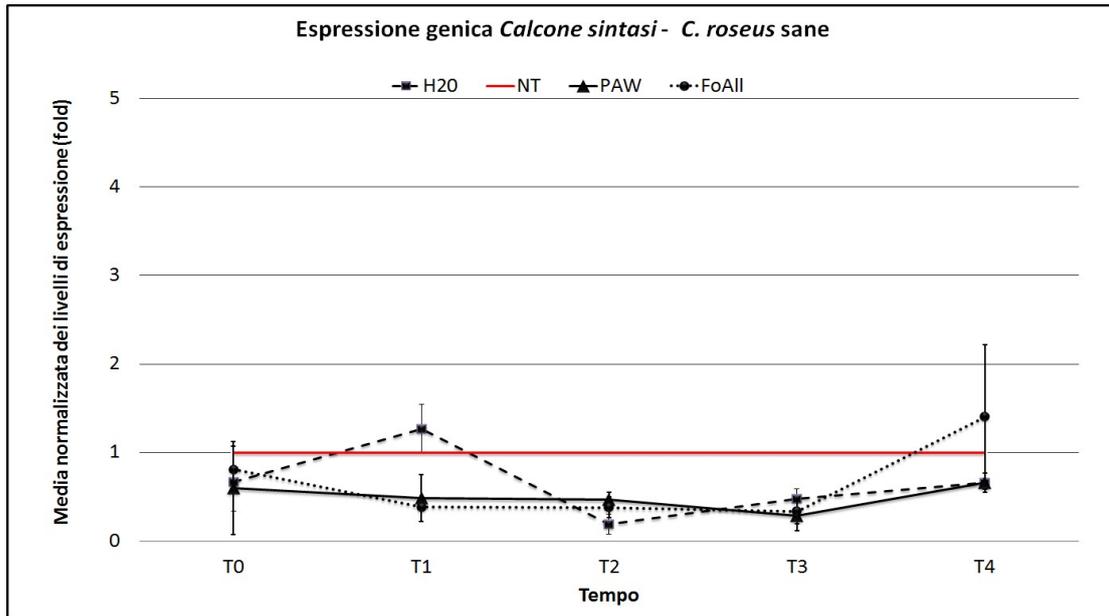
**Grafico 2.** Cinetica di espressione del gene *CrCalS11* in germogli di *C. roseus* sani dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrCalS11* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)

### 2.3.2. Gene calcione sintasi

Gli esperimenti di espressione condotti su calcione sintasi (gene *CrCHS*) non evidenziano differenze statisticamente significative tra le tesi analizzate in entrambe le prove sia nei germogli infetti che sani. La cinetica di espressione del gene *CrCHS* è pressochè identica in tutte e tre le tesi (PAW, FoAl, ddH<sub>2</sub>O) ed in entrambe le prove evidenziando livelli di espressione pari o leggermente inferiori alla media dei controlli non trattati (Grafici 3 e 4).



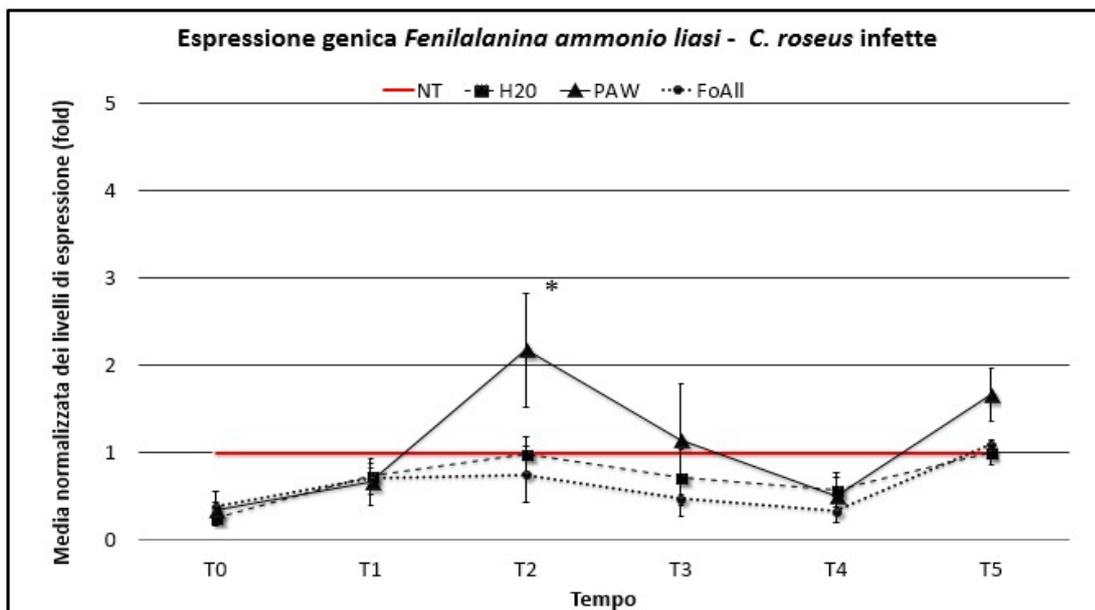
**Grafico 3.** Cinetica di espressione del gene *CrCHS* in germogli di *C. roseus* infetti con fitoplasma Hydrangea 35 (16SrI-B) dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrCHS* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t.



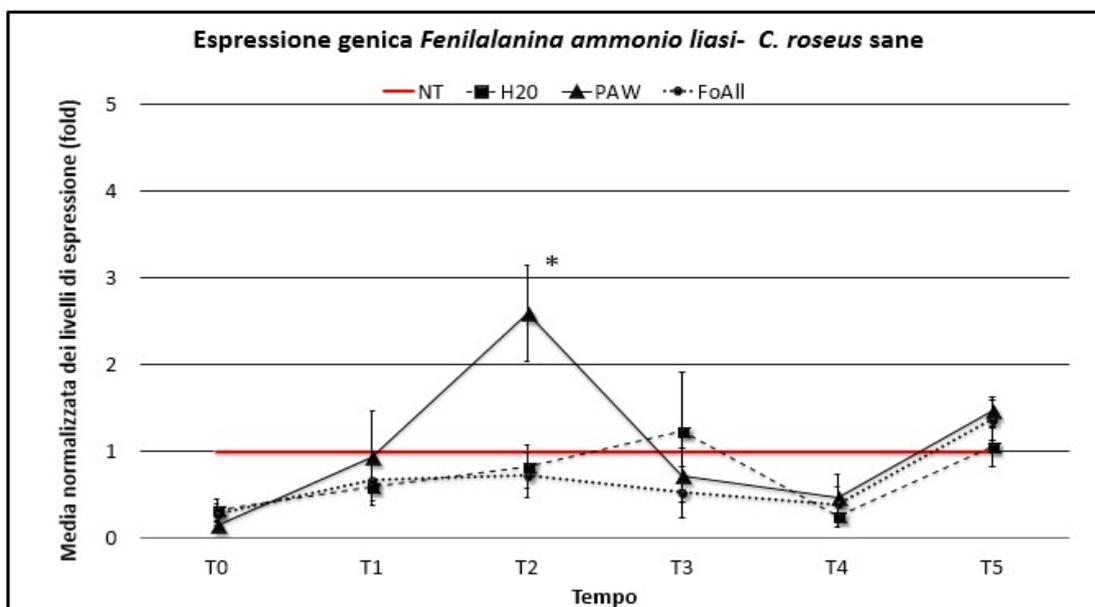
**Grafico 4.** Cinetica di espressione del gene *CrCHS* in germogli di *C. roseus* sani dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); H<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrCHS* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t.

### 2.3.3. Gene fenilalanina ammonio liasi

L'espressione del frammento del gene putativo della fenilalanina ammonio liasi (*CrPAL1*) evidenzia un aumento statisticamente significativo dei livelli di trascrizione nella tesi trattata con PAW al tempo 2 (24 ore p.t.) pari a 2,6 volte i controlli non trattati, nella prova svolta sul sano, mentre nell'infetto l'incremento di espressione registrato è stato superiore di 2,2 unità rispetto ai controlli interni. La cinetica di espressione riscontrata nelle due prove (germogli infetti-germogli sani) è pressochè identica confermando la risposta del gene fenilalanina ammonio liasi al trattamento con PAW. Nessuna differenza è stata invece registrata nelle tesi trattate con FoAl e H<sub>2</sub>O; in entrambi i casi i livelli di espressione riscontrati erano pressochè uguali a quelli riscontrati nei germogli non trattati (Grafici 5 e 6).



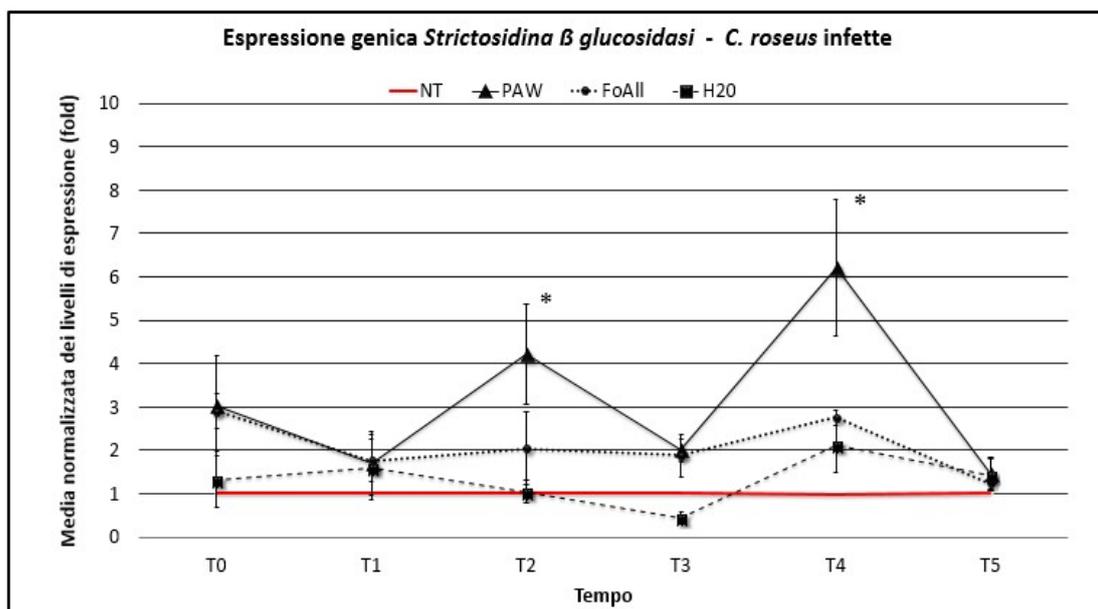
**Grafico 5.** Cinetica di espressione del gene *CrPAL1* in germogli di *C. roseus* infetti con fitoplasma *Hydrangea* 35 (16SrI-B) dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrPAL1* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).



**Grafico 6.** Cinetica di espressione del gene *CrPAL1* in germogli di *C. roseus* sani dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrPAL1* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).

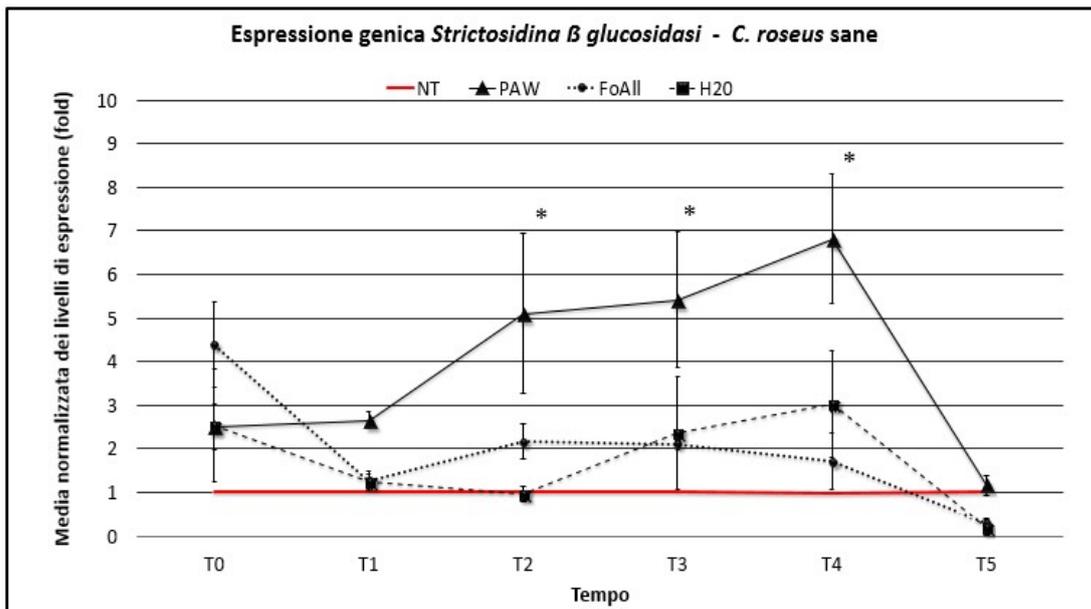
### 2.3.4. Gene strictosidina- $\beta$ -glucosidasi

L'analisi qRT-PCR del frammento genetico codificante per strictosidina- $\beta$ -glucosidasi (*CrSGD*) evidenzia livelli di espressione più elevati solamente in risposta al trattamento con PAW. In entrambe le prove, sia i germogli infetti che quelli sani, mostrano differenze statisticamente significative nei livelli trascrizionali del gene *CrSGD* nella tesi PAW rispetto ai controlli non trattati e alle altre tesi in esame. Sebbene il gene analizzato manifesti livelli trascrizionali più elevati a seguito di trattamento con PAW in entrambe le prove svolte, le cinetiche di espressione nei germogli malati e sani sono risultate differenti. In particolare, le piante infette hanno manifestato un andamento altalenante, evidenziando un aumento dei trascritti pari a 4,2 volte i controlli non trattati al tempo 2 (24 ore p.t.) per poi diminuire al tempo 3 (48 ore p.t.) a livelli statisticamente non significativi e raggiungendo il picco massimo al tempo 4 (96 ore p.t.) delineando livelli di espressione statisticamente maggiori di 6,2 volte rispetto ai controlli non trattati; al rilevamento successivo, 120 ore dal trattamento, i valori di espressione rinvenuti erano pressochè identici tra tutte le tesi in esame (Grafico 7).



**Grafico 7.** Cinetica di espressione del gene *CrSGD* in germogli di *C. roseus* infetti con fitoplasma Hydrangea 35 (16SrI-B) dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrSGD* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).

La prova svolta sui germogli sani ha delineato invece una cinetica di espressione più costante: al primo picco di espressione al tempo 2 (24 p.t.) è seguito un aumento progressivo anche al tempo 3 (48 p.t.) e al tempo 4 (96 ore p.t.). Sono stati registrati aumenti statisticamente significativi dei trascritti del gene *CrSGD* rispetto ai controlli non trattati pari a 5,1 – 5,4 e 6,8 unità rispettivamente a T2, T3 e T4 (Grafico 8).

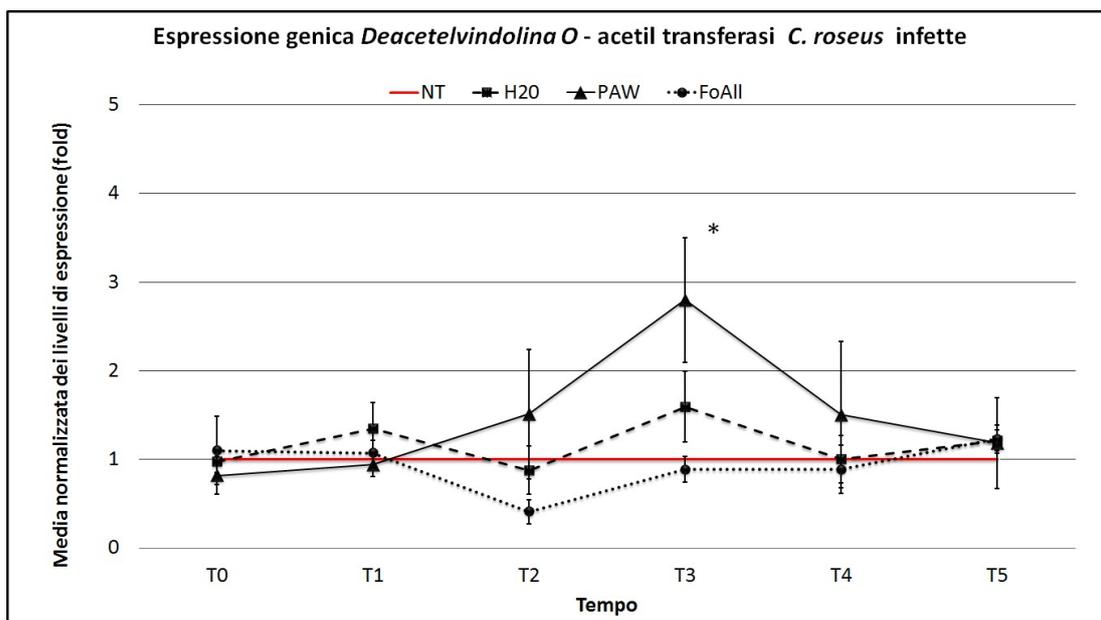


**Grafico 8.** Cinetica di espressione del gene *CrSGD* in germogli di *C. roseus* sani dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrSGD* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).

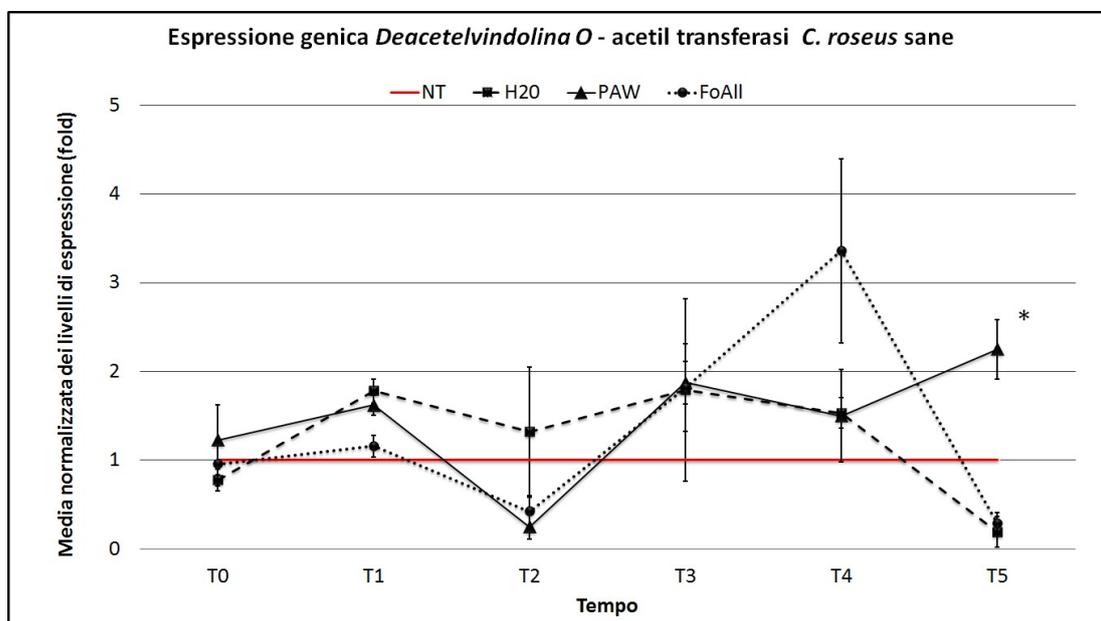
### 2.3.5. Gene deacetilvindolina-O-acetiltransferasi

L'amplificazione del frammento di sequenza corrispondente a deacetilvindolina-O-acetiltransferasi (*CrDAT*) evidenzia un andamento altalenante e discontinuo in tutte le tesi analizzate (PAW, FoAl e ddH<sub>2</sub>O) sia nei germogli infetti che in quelli sani.

La cinetica di espressione registrata nella prova eseguita sui germogli infetti si discosta da quella ottenuta nei germogli sani. In particolare, nell'esperimento svolto sui germogli infetti si è registrato un picco di espressione statisticamente significativo al T3 nella tesi trattata PAW, mentre nei germogli sani un picco di espressione non statisticamente significativo, è stato riscontrato a T4 nella tesi trattata con FoAl (Grafici 9 e 10).



**Grafico 9.** Cinetica di espressione del gene *CrDAT* in germogli di *C. roseus* infetti con il fitoplasma Hydrangea 35 (16SrI-B) dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrDAT* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).

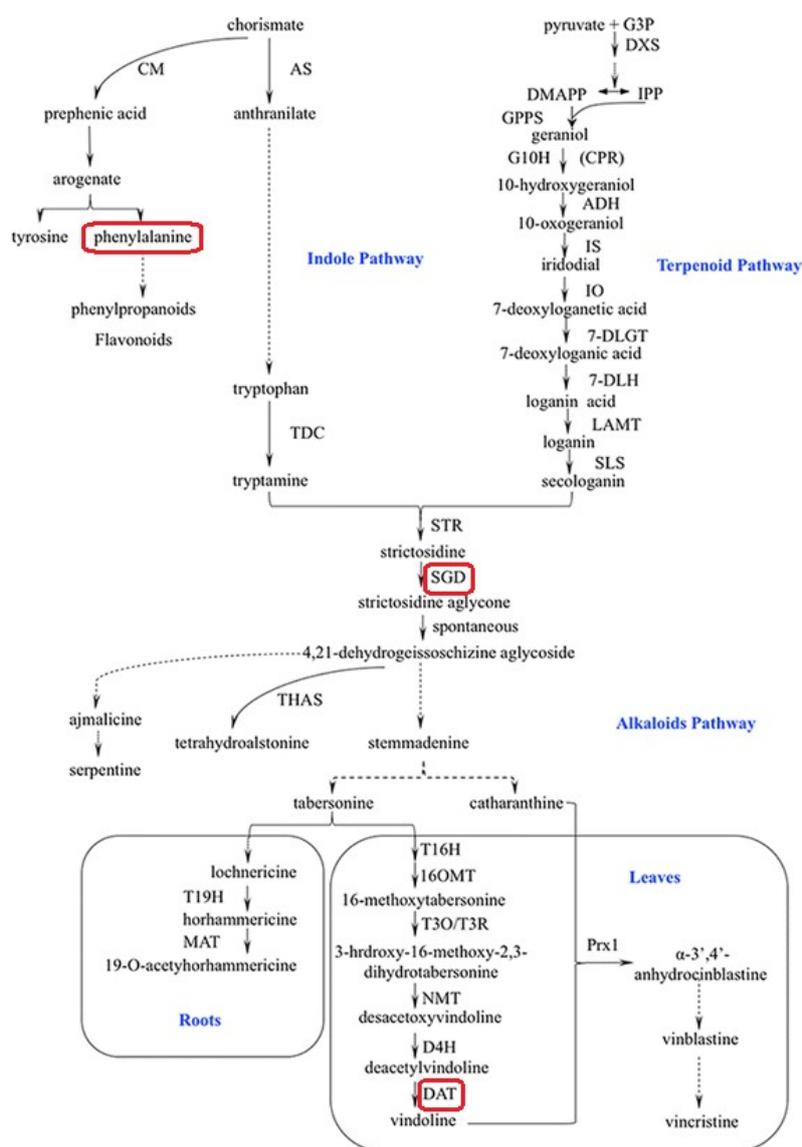


**Grafico 10.** Cinetica di espressione del gene *CrDAT* in germogli di *C. roseus* sani dopo trattamento per sommersione con: PAW (triangolo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *CrDAT* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T0 = fine trattamento; T1= 7 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 24 ore d.t.; T3 = 48 ore d.t.; T4 = 96 ore d.t.; T5 = 120 ore d.t. (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).

Sebbene l'andamento di espressione genica rilevato nei germogli infetti sia diverso da quello ottenuto nei germogli sani, in entrambi gli esperimenti la tesi trattata con PAW presenta dei livelli superiori di espressione rispetto ai controlli a determinati tempi; in particolare nei germogli malati si stabilizza su livelli di espressione superiori ai controlli a partire dal tempo 3, mentre in quelli sani si evidenzia un picco statisticamente significativo al tempo 5.

### 3. DISCUSSIONE

Al fine di valutare il possibile impiego di PAW per l'elicitazione di risposte di difesa atte a limitare la presenza di fitoplasmi sono state studiate le cinetiche di espressione di alcuni geni coinvolti nell'interazione pianta-fitoplasma. Lo studio di espressione genica si è concentrato sull'espressione di geni codificanti una callosio sintasi, fenilalanina ammonio liasi, una calcione sintasi, strictosidina- $\beta$ -glucosidasi e deacetilvindolina-O-acetiltransferasi. E' noto che tutti questi geni sono coinvolti nelle risposte di difesa delle piante ai patogeni ed in particolare nell'interazione pianta-fitoplasma (Dixon *et al.*, 1995; Musetti, 2010; Landi *et al.*, 2011; Nejat *et al.*, 2012). Il gene *CrCalS11* è uno dei geni presenti in *C. roseus* codificanti callosio sintasi; studi istologici su numerose specie vegetali hanno dimostrato che la deposizione di callosio a livello di placca cribrosa nei tessuti conduttori è una delle prime aberrazioni a carico dell'ospite che si riscontrano in caso di infezione da parte di fitoplasmi; generalmente l'accumulo di callosio rappresenta una risposta aspecifica delle piante in risposta all'attacco di un patogeno o ad una ferita (Musetti, 2010). Studi condotti da Miotti, 2013 su piante di *C. roseus* hanno evidenziato inoltre come il gene *CrCalS11* risulti essere quattro volte più espresso nelle piante infette da fitoplasmi rispetto ai controlli sani. Il gene *CrPAL1*, codificante fenilalanina ammonio liasi è stato ampiamente studiato nelle relazioni pianta-patogeno in quanto catalizzatore del primo step nella via biosintetica dei fenilpropanoidi e composto chiave nella sintesi dei precursori di acido salicilico, fitoalessine e lignina (Landi *et al.*, 2011; Figura 8).



**Figura 8.** Rappresentazione schematica delle principali vie metaboliche analizzate nello studio in risposta al trattamento con PAW. In rosso sono evidenziati i geni coinvolti nell’analisi di espressione genica (da Sun *et al.*, 2016).

La resistenza di alcune varietà di viti ad attacchi di alcuni patogeni fungini è stata correlata ad una regolazione positiva del gene PAL, scoperta che conferma il ruolo fondamentale di questa molecola nell’interazione pianta-patogeno (Figueiredo *et al.*, 2008). L’espressione di questo gene in piante infette da fitoplasmii è stata studiata da Landi *et al.* 2011 in vite nelle varietà Chardonnay e Sangiovese; l’analisi ha riguardato piante sintomatiche infette da “bois noir” (BN) e piante soggette a “recovery” indotto mediante stratonamento. Nelle piante infette l’analisi è stata eseguita su due tipologie di foglie, sintomatiche ed asintomatiche. Lo

studio ha evidenziato una sovraespressione di PAL sia nelle foglie sintomatiche delle piante infette sia nelle piante “recovered”. Il profilo di espressione è invece risultato diverso nelle foglie asintomatiche delle piante malate: mentre nelle foglie di Sangiovese l’espressione risultava più alta rispetto alle piante sane, nelle foglie di Chardonnay non è stata determinata alcuna variazione. Tale differenza viene giustificata dagli autori con la diversa suscettibilità delle due varietà alla malattia (maggiore in Chardonnay) avvalorando l’idea che questo gene possa avere un ruolo determinante nell’interazione pianta-fitoplasma (Landi *et al.*, 2011).

L’analisi ha coinvolto successivamente il gene *CrCHS*, codificante la calcione sintasi, enzima chiave nella via biosintetica dei fenilpropanoidi ove catalizza la condensazione del malonyl-CoA con il p-coumaroyl-CoA per la formazione della naringenina-calcione (Yamada *et al.*, 2013). In vite questo enzima, fondamentale per la produzione di fitoalessine, è risultato sovraespresso in piante di Chardonnay e di Sangiovese “recovered” (Landi *et al.*, 2011).

Allo scopo di investigare l’effetto del trattamento con PAW in più vie metaboliche implicate nelle risposte di difesa/stress è stata poi valutata l’espressione del gene *CrSGD*, codificante la strictosidina- $\beta$ -glucosidasi, enzima fondamentale nella produzione di alcaloidi in *C. roseus*, in quanto converte la strictosidina in catenamina generando importanti composti farmaceutici (Guirimand *et al.*, 2010; Figura 8). Mediante questa via biosintetica vengono prodotti importanti composti quali la vinblastina e la vincristina, utilizzate nella chemioterapia contro il cancro, la ajmalacina utilizzata come antiipertensivo e la serpentina generalmente utilizzata come sedativo (Canto-Canche *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 1993; Sottomayor *et al.*, 2004). Nella pianta questi composti ed in particolare la catarantina (precursore della vinblastina), la vinblastina, e la vindolina svolgono un’importante attività repellente contro gli animali erbivori ed hanno una spiccata attività antimicrobica capace di limitare la crescita di patogeni fungini e batterici (Luijendijk *et al.*, 1996). Studi condotti su piante di *C. roseus* sperimentalmente e naturalmente infette con *Spiroplasma citri* hanno evidenziato una sovraespressione del gene *CrSGD* nelle piante malate rispetto ai controlli sani avvalorando l’implicazione della strictosidina- $\beta$ -glucosidasi nelle risposte di difesa della pianta e nella sua attività antimicrobica (Nejat *et al.*, 2012; Luijendijk *et al.*, 1996).

L’ultimo gene analizzato è stato *CrDAT* codificante la deacetilvindolina-O-acetiltransferasi, enzima a valle della via biosintetica degli alcaloidi e fondamentale per la sintesi di vindolina (Mujib *et al.*, 2012) (Figura 8).

I risultati ottenuti dall'analisi qRT-PCR hanno evidenziato, a seguito del trattamento con PAW, una sovraespressione dei geni *CrCals11*, *CrPAL1* e *CrSGD* in entrambe le tesi prese in esame (germogli infetti-germogli sani). Differenze statisticamente significative sono state determinate anche per il gene *CrDAT* sebbene le cinetiche di espressione tra le due prove siano risultate differenti. Per quanto riguarda invece il gene *CrCHS* non è stata riscontrata alcuna differenza tra le tesi analizzate.

In merito al gene *CrCals11* è stato riscontrato un aumento significativo dei trascritti sia nelle tesi trattate con PAW sia nelle tesi trattate con FoAl al tempo 1 ossia a 7 ore post trattamento. L'espressione è risultata maggiore a seguito del trattamento con FoAl evidenziando valori 6,7 volte superiori nei germogli infette e 7,5 volte superiori nei germogli sani rispetto ai controlli non trattati. Per quanto riguarda la risposta al trattamento con PAW è stato registrato un incremento dei trascritti pari a 3,8 e 2,9 volte i controlli rispettivamente nella prova eseguita sui germogli sani e malati. La sovraespressione di questo gene in risposta al trattamento con PAW, potrebbe essere legata alla presenza in soluzione di specie reattive quali ROS, RNS ed in particolare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che potrebbero aver generato uno stress ossidativo a carico dei tessuti vegetali; diversi studi correlano infatti la deposizione di callosio a vari livelli come una risposta generica a stress di origine biotica ed abiotica (Ellinger *et al.*, 2014). La sintesi di callosio e l'aggregazione di filamenti proteici nel floema sono regolati dal flusso degli ioni Ca<sup>2+</sup> al suo interno e fungono da composti chiave per limitare la diffusione e il movimento dei fitoplasmi in pianta (Musetti *et al.*, 2008). In piante di melo e di albicocco è stato dimostrato come il fenomeno del "recovery" coincida con l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei tessuti cribrosi, fenomeno che genera generalmente deposizione di callosio e produzione di filamenti proteici (Musetti *et al.*, 2005, 2007, 2010). La sovraespressione del gene *CrCals11* nei germogli trattati con PAW potrebbe essere legata alla presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che influenzando l'apertura dei canali del Ca<sup>2+</sup> induce deposizione di callosio come risposta allo stress ossidativo. Sebbene questo gene sia risultato più espresso in piante di *C. roseus* infette da fitoplasmi rispetto ai controlli sani (Miotti, 2013) la sua azione non risulterebbe compatibile con una deposizione di callosio a livello floematico, in quanto mutazioni dell'ortologo di questo gene in *A. thaliana* non sono associate a disturbi nella regolazione del sistema vascolare della pianta, ma ad una diminuzione della fertilità dovuta ad un alterato sviluppo dei granuli pollinici (Enss *et al.*, 2005). Questa

considerazione pone qualche interrogativo sul ruolo del gene *CsCalS11* in *C. roseus* e soprattutto sull'azione che esso svolge nell'interazione pianta-fitoplasma, un quadro più chiaro si potrà avere quando saranno disponibili le sequenze per tutte le callosio sintasi espresse nel genoma di vinca.

L'analisi di espressione effettuata sul gene codificante fenilalanina ammonio liasi (*CrPAL1*) ha evidenziato livelli di trascritti statisticamente superiori nelle tesi trattate PAW al tempo 2 (24 ore post trattamento) in entrambe le prove svolte. L'espressione è risultata essere 2,1 e 2,6 volte superiore ai controlli, rispettivamente nei germogli malati e sani. In questo caso il trattamento con FoAl, in entrambe le prove, non ha manifestato alcun effetto nell'espressione del gene esaminato. Studi svolti su specie di tabacco con diversi gradi di suscettibilità nei confronti di *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* hanno evidenziato come, piante trattate con FoAl manifestino una sovraespressione del gene PAL di circa il 47% rispetto ai controlli riuscendo conseguentemente ad accumulare una quantità superiore di fitoalessine (Nemestothy *et al.*, 1990). Esperimenti condotti sullo stesso patosistema hanno determinato, a seguito del trattamento, un aumento considerevole nelle prime 48 ore della fitoalessina capsidiolo confermando la predisposizione di questo composto nell'attivare alcune forme di difesa dell'ospite (Guest, 1984). Il fatto di non aver registrato, nelle prove svolte su *C. roseus*, nessun effetto a carico del gene *CrPAL* potrebbe essere dovuto alla breve esposizione dei germogli alla soluzione contenente FoAl (25 minuti) che potrebbe averne limitato l'assorbimento e quindi l'azione. Inoltre, prove recenti svolte sul patosistema patata-*Phytophthora infestans* hanno evidenziato come l'attività di FoAl sia legata alla presenza del patogeno nell'ospite, in assenza di esso infatti non è stata riscontrata, dagli autori, nessuna differenza nella produzione di fitoalessine (Andreu *et al.*, 2006). Tale fenomeno sembrerebbe legato al fatto che FoAl agisca inizialmente a carico delle cellule del patogeno e che solo successivamente induca risposte di difesa a carico dell'ospite (Andreu *et al.*, 2006). Questo potrebbe giustificare il comportamento riscontrato nelle piante di *C. roseus* ove, la mancanza di un patogeno fungino potrebbe aver limitato l'attività del controllo positivo. L'induzione della trascrizione del gene *CrPAL1* registrata in entrambe le prove (germogli infetti-sani) a seguito della loro esposizione a PAW può essere dovuta alla presenza in soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>2-</sup> e NO<sup>3-</sup> composti utilizzati dalla pianta come segnali per attivare diverse vie metaboliche di risposta a stress (Lamb & Dixon 1997; Li *et al.*, 2006).

Evidenze scientifiche dimostrano che l'ossido di azoto (NO) ed i suoi donatori attivano la trascrizione del gene *PAL* tramite meccanismi cGMP-dipendenti (guanosin-monofosfato ciclico), attraverso i quali, alte concentrazioni di NO nella cellula generano la liberazione di calcio intracellulare attivando i segnali traduzionali mediati da cGMP (Durner *et al.*, 1998; Wendehenne *et al.*, 2004). Diverse vie sono state individuate per la produzione di NO in pianta: una riducente in cui nitrati e nitriti vengono utilizzati come substrato principale ed include nitrato reductasi citoplasmatica (NR) e di membrana ("nitrite-NO reductase") ed una riduzione del nitrito a livello mitocondriale; la seconda via metabolica, ossidativa, include invece la produzione di ossido di azoto a partire da L-arginina, poliammine o idrossilammine (Gupta *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Li, 2016). Paralleleamente all'effetto di NO, l'induzione del gene *PAL* nei trattati PAW, può essere stata influenzata anche dalla presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in soluzione, che è generalmente considerata il principale intermediario nell'attivazione della resistenza indotta. Svartati studi correlano l'induzione del gene *PAL* alla presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle cellule vegetali, reazione che porta tendenzialmente alla risposta di ipersensibilità (Chen *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 2000; Kachroo *et al.*, 2003). I risultati ottenuti sono parzialmente in accordo con gli esperimenti condotti da Perez, 2016 in piante di pomodoro ove, a seguito di bagno radicale con PAW è stata determinata la sovraespressione del gene *PAL* nelle prime ore post trattamento. Nel suddetto esperimento l'espressione del gene codificante la fenilalanina ammonio liasi evidenziava livelli significativamente maggiori dei propri trascritti sino a 8 giorni dal trattamento evidenziando una cinetica di espressione più duratura di quella riscontrata nella prova qui descritta. Queste variazioni comportamentali potrebbero essere dovute alle diverse specie vegetali utilizzate, alle diverse forme di coltura (*vivo-vitro*) ed alle diverse modalità di trattamento/esposizione (bagno radicale-sommersione). Nella prova sopra citata l'autore non riscontra, a seguito della sovraespressione del gene *PAL*, una correlazione positiva nei livelli dei trascritti delle principali proteine di patogenesi (PR-1, PR-4, PR-5); la mancata induzione di queste proteine potrebbe essere connessa ad un accumulo eccessivo, a seguito del trattamento, di S-nitrosoglutatione (GSNO), nitrosotiole coinvolto in diverse reazioni cellulari. Studi condotti da Feechan, 2015 evidenziano come alti livelli di suddetto composto possano limitare i segnali indotti dall'acido salicilico e quindi non indurre l'espressione di PR. Inoltre, sebbene il gene *PAL* sia generalmente connesso all'attivazione di "PR-proteins", sembra che la sua

induzione mediata da NO sia indipendente dall'acido salicilico giustificando la mancata espressione delle proteine di patogenesi (Durner *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2011). A tal proposito, in questo esperimento, si è deciso di investigare le principali vie metaboliche attivate in seguito a stimoli di origine biotica ed abiotica ma non correlate all'accumulo di acido salicilico e quindi all'attivazione delle proteine di patogenesi. Livelli di espressione statisticamente maggiori sono stati determinati a seguito del trattamento con PAW, anche per il gene *CrSGD* codificante strictosidina- $\beta$ -glucosidasi, enzima chiave nella via biosintetica degli alcaloidi. In particolare, nella prova eseguita sulle piante infette, sono stati riscontrati aumenti significativi della quantità di mRNA trascritto pari a 4,2 e 6,2 volte i controlli rispettivamente al tempo 2 (24 ore p.t) ed al tempo 4 (96 ore p.t). Comportamento simile ma più costante e duraturo nel tempo è stato invece evidenziato nella prova eseguita su *C. roseus* esenti da fitoplasma ove, al picco iniziale al tempo 2 è seguito un aumento costante al tempo 3 e al tempo 4 evidenziando rispettivamente un'espressione genica di 5, 5,4 e 6,8 volte i controlli non trattati. Entrambe le prove hanno dimostrato la risposta del gene *CrSGD* a PAW, in entrambi i casi il picco iniziale di espressione è stato rilevato a 24 ore p.t. attestandosi su valori pressochè uguali. La diminuzione dei livelli di trascritti al tempo 3 (48 ore p.t.), nella prova eseguita sui germogli infetti a differenza di quelli sani, si suppone sia correlata alla presenza del fitoplasma che potrebbe aver modificato ed influenzato la via metabolica di risposta attivata dalla pianta. Studi condotti da Nejat *et al.*, 2012 hanno evidenziato come, piante di *C. roseus* infette con *Spiroplasma citri* esprimano maggiormente il gene *CrSGD* proponendo un suo ruolo attivo nell'interazione pianta-spiroplasma. Dai risultati ottenuti in questa prova sembra che il fitoplasma *hydrangea* 35 (16SrI-B) non abbia influenzato positivamente l'espressione del gene ma bensì abbia interferito sulla sua attivazione; paragonando infatti, i picchi di espressione al tempo 2 ed al tempo 4 nelle due prove svolte emerge che i valori dei germogli infetti risultano lievemente inferiori a quelli dei germogli sani. Questa diversa interazione pianta-patogeno potrebbe essere dovuta, oltre che ai diversi agenti coinvolti, al materiale vegetale utilizzato. Nella prova in esame il mantenimento in micropropagazione dei germogli di *C. roseus* infetti per circa una ventina di anni, potrebbe aver generato una sorta di adattamento tra l'ospite e il patogeno; in aggiunta, tale difformità potrebbe essere dovuta alla diversa fisiologia nel sistema *in vitro* ove i germogli non presentano radici. In ogni caso il fatto che la pianta, a seguito di infezioni

da spiroplasma/fitoplasmi, reagisca attivando la medesima via metabolica indotta dal trattamento con PAW può far pensare che l'applicazione di PAW nelle prime fasi di infezione o ancor meglio, in prevenzione, possa influenzare positivamente il decorso della malattia. L'induzione riscontrata in ambo le prove a carico del gene *CrSGD* è probabilmente legata alla presenza di perossido di idrogeno in PAW. Studi condotti da Tang *et al.*, 2009 hanno dimostrato come l'apporto su piante di *C. roseus* di diverse concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esogena generi un aumento del contenuto di diversi alcaloidi tra cui vinblastina, vindolina e catarantina. Comportamento analogo è emerso anche in altre specie vegetali ove l'accumulo degli alcaloidi nicotina e berberina, a seguito di stress ossidativo indotto da fattori biotici ed abiotici, è risultato essere nettamente superiore (De Luca & St Pierre 2000; Chou & Kutchan 1998; De Luca *et al.*, 1986). L'induzione di questa via metabolica in *C. roseus* è stata riscontrata anche in seguito a trattamento con jasmonato di metile ove è stato dimostrato un aumento di espressione del gene *STR* codificante strictosidina sintasi, fase precedente all'attivazione di *CrSGD* (Wei *et al.*, 2010).

L'ultimo gene ad aver dimostrato una induzione positiva, sebbene meno chiara che negli altri casi, a seguito del trattamento con PAW è il gene *CrDAT* codificante la deacetilvindolina-O-acetiltransferasi, enzima determinante per la sintesi di vindolina. In questo caso le cinetiche di espressione riscontrate nelle due prove svolte (germogli sani-germogli malati) sono risultate differenti. E' stato riscontrato un aumento significativo dei livelli dei trascritti al tempo 5 (120 ore p.t.) pari a 2,25 volte i controlli nella prova eseguita sui germogli sani mentre per quanto riguarda quelli infetti il picco di espressione è stato riscontrato al tempo 3 (48 ore p.t.) con un valore superiore di 2,8 unità. Anche l'espressione riscontrata nelle tesi trattate con FoAl risulta discordante tra le prove svolte evidenziando un incremento, seppur non significativo, dei relativi trascritti solo nei germogli sani e precisamente al tempo 4 (96 ore p.t.). A seguito del trattamento con PAW, in entrambe le tesi, l'espressione del gene *CrDAT* inizia ad aumentare a partire dal tempo 3 (48 ore p.t.) evidenziando però una differenza significativa tra le tesi solamente nei germogli infetti. Nei tempi successivi le due tesi manifestano comportamenti differenti: mentre nei germogli infetti i livelli dei trascritti tornano alla normalità, nei germogli sani essi si mantengono pressochè uguali aumentando, seppur leggermente, al tempo 5 (120 ore p.t.) ove viene riscontrata una differenza statisticamente significativa rispetto alle altre tesi. Le cinetiche di

espressione, in questo caso, non risultano molto chiare; è plausibile comunque supporre che il diverso comportamento riscontrato a carico del gene *CrSGD* (gene a monte di *CrDAT*) possa aver modificato le successive reazioni metaboliche ed anche la loro tempistica di espressione generando un comportamento diverso del gene *CrDAT* situato a valle della catena metabolica. Valutando i risultati emerge comunque come, in entrambe le prove, le uniche differenze significative siano state riscontrate nelle tesi trattate PAW suggerendo una correlazione positiva tra il trattamento e l'espressione del gene in esame. Studi condotti da Verma *et al.*, 2012 su piante di *C. roseus* hanno dimostrato come l'espressione del gene *CrDAT* sia, a differenza del gene *CrSGD*, limitata a specifici tessuti vegetali. Gli autori sostengono che l'attività di questo gene sia presente solamente nelle cellule laticifere, incorporate nel tessuto a palizzata delle foglie, e che essa tenda a diminuire mano a mano che i tessuti invecchiano (Verma *et al.*, 2012). Questo potrebbe spiegare i risultati discordanti ottenuti dall'analisi dei trascritti del gene *CrDAT* nelle due prove svolte; il fatto che la sua attività, sia strettamente legata all'età dei tessuti vegetali, potrebbe aver influenzato il risultato dell'analisi e soprattutto potrebbe aver evidenziato livelli di espressioni minori rispetto ai geni precedenti i quali non sembrano legati alla stessa dinamica. Infine il gene *CrCHS* non ha evidenziato alcuna differenza di espressione tra le tesi in entrambe le prove. L'attività di questo gene in *C. roseus* è implicata nelle interazioni proteina-proteina (Graham, 1998) e sembra essere localizzata nei tessuti dell'epidermide (Kaltenbach *et al.*, 1999). Inoltre, la sua attività sembrerebbe, a differenza di altri geni coinvolti nella medesima via biosintetica, strettamente dipendente dalla luce (Kaltenbach *et al.*, 1999). In relazione ai risultati ottenuti l'effetto del trattamento PAW in *C. roseus* evidenzia un'attività prevalente a carico della via biosintetica degli alcaloidi mentre non sembra influenzare il "pathway" di produzione dei flavonoidi.

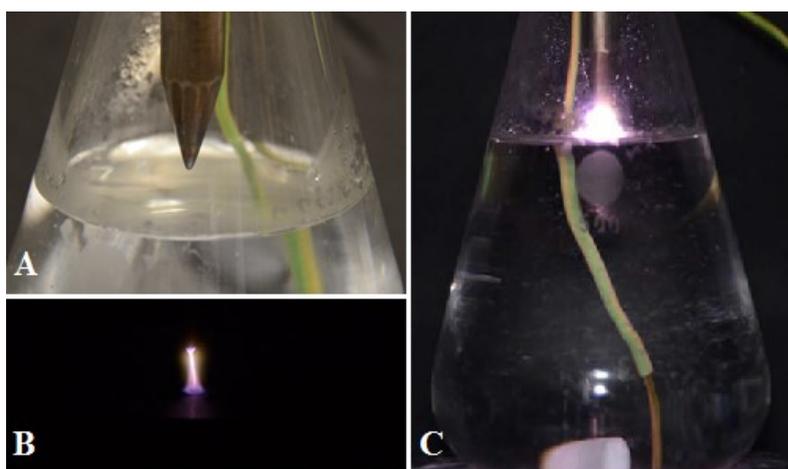
## CAPITOLO 2

### Effetti del trattamento PAW in vite *in vivo*

#### 1. MATERIALI E METODI

##### 1.1. Acqua attivata al plasma

In questa sperimentazione l'azione di PAW prodotto come descritto precedentemente (capitolo 1, paragrafo 1.1), è stata comparata con quella di una seconda tipologia di PAW prodotta mediante sorgente a corona ("corona discharge", CD; Figura 9). D'ora in poi verrà denominata PAW1 la soluzione ottenuta mediante generatore DBD e PAW2 quella prodotta mediante sorgente a corona.



**Figura 9.** Fotografia della sorgente a corona. A) elettrodo in metallo; B) scarica generata durante il trattamento; C) trattamento dell'acqua contenuta nel contenitore di vetro borosilicato.

La sorgente a corona consiste di un elettrodo in metallo connesso ad un polo del generatore di alta tensione. L'elettrodo presenta una estremità acuminata, posizionata a 12 mm dalla superficie liquida dell'acqua da trattare. All'altro polo è invece connessa una superficie in alluminio sulla quale viene appoggiato il contenitore in vetro borosilicato contenente l'acqua da trattare. Il generatore di alta tensione in questo caso eroga un impulso avente tensione di picco pari a 15 kV con una frequenza di 5 kHz. Mediante questa tipologia di sorgente il trattamento viene eseguito su acqua di rubinetto ed è possibile produrre 450 ml di PAW2 in 10 minuti.

<b>Soluzione</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [mM]</b>	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [mM]</b>	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [mM]</b>	<b>pH</b>
PAW1	0,2	2,4	0	2,5
PAW2	0,2	5,6	0,8 - 1,7	6,5

**Tabella 7.** Profili chimici delle due tipologie di PAW utilizzate.

Entrambe le tipologie di trattamento generano all'interno della soluzione la presenza di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ione nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e ione nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); la caratteristica che cambia maggiormente tra PAW1 e PAW2 è il pH che, essendo nel secondo caso vicino alla neutralità, rende la soluzione più stabile riuscendo a preservare per un tempo più lungo i nitriti in essa presenti. Allo scopo di determinare le differenze a livello chimico tra le due soluzioni ottenute, mediante "strip" analitiche Quantofix® (capitolo 1, paragrafo 1.1) sono state misurate le concentrazioni dei principali RONS ed i pH di PAW1 e PAW 2 (Tabella 7).

## **1.2. Materiale vegetale**

Verso la metà di gennaio 2016 cinquanta barbatelle di vite *cv.* Chardonnay portinnesto 140RU-numero di lotto ZP d4, gentilmente fornite dal Dr. E. Murari, vivai cooperativi VCR, Rauscedo (PN) sono state invasate e poste in serra. Durante il primo anno, sono stati eseguiti al bisogno trattamenti insetticidi/fungicidi atti a limitare l'insorgenza di malattie o infestazioni che avrebbero potuto compromettere la sanità delle piante e la riuscita dell'esperimento. Ad inizio 2017, allo scopo di limitare qualsiasi interferenza esterna di origine biotica che avrebbe potuto influenzare l'espressione genica delle piante in esame, è stato costruito un sistema di irrigazione automa per tutte le viti e l'intero banco è stato coperto con rete anti-afide (Figura 10). In questo modo, per tutto il periodo antecedente il trattamento le piante non sono mai state scoperte limitando il più possibile le interferenze esterne.



**Figura 10.** Barbatelle *cv.* Chardonnay poste in serra irrigate mediante sistema idraulico chiuso ed autonomo e coperte con rete anti-afide.

### **1.3. Valutazione della trascrizione dei geni di difesa**

#### **1.3.1. Trattamento e campionamento**

Le viti *cv.* Chardonnay sono state utilizzate per valutare e quantificare la trascrizione di alcuni geni di resistenza a seguito di trattamento con PAW1 e PAW2. L'azione delle due soluzioni in esame è stata comparata con quella di FoAl (controllo positivo), ddH<sub>2</sub>O e di controlli non trattati (NT). I trattamenti sono stati condotti mediante bagno radicale con l'obiettivo di massimizzare i quantitativi di soluzione assorbiti da parte delle piante.

La prova è stata eseguita ad agosto 2017 ossia un anno e otto mesi dopo la messa a dimora delle barbatelle in serra; le piante sono state divise nei quattro gruppi: i) PAW1; ii) PAW2; iii) FoAl; iv) ddH<sub>2</sub>O e iv) non trattato. Ogni tesi era composta da nove piante ossia, tre repliche biologiche per tre diversi tempi di analisi. Allo scopo di facilitare l'assorbimento radicale da parte delle piante e limitare le interferenze generate dal contatto tra terreno e PAW, i vasi sono stati forati per permettere la fuoriuscita delle radici. Le radici sono state dunque pulite e liberate dalla terra. Durante i 25 giorni seguenti ogni singola vite è stata irrigata mediante gocciolatore autonomo solamente attraverso le radici esposte per adattarle al trattamento. Si è deciso di svolgere la prova 25 giorni dopo l'esposizione radicale in modo da evitare interferenze di espressione genica dovute alla manipolazione delle piante.

L'analisi è stata eseguita su tre tempi T1= 16 ore post trattamento, T2= 26 ore p.t. e T3= 36 ore p.t. e su tre repliche biologiche (Tabella 8).

Tesi	Molecole attive	Volume* (ml)	n° di piante per replica			Referenza
			T1	T2	T3	
PAW1	ROS; RNS	450	3	3	3	Gruppo-AlmaPlasma
PAW2	ROS; RNS	450	3	3	3	
FoAI	Fosetyl all.	450	3	3	3	Bayer
ddH <sub>2</sub> O	/	450	3	3	3	/
NT	/	/	3	3	3	/

**Tabella 8.** Schema rappresentativo dell'esperimento; \* volume di soluzione utilizzato per il bagno radicale.



**Figura 11.** Vite *cv.* Chardonnay trattata con PAW1 mediante bagno radicale.

Il trattamento è stato eseguito immergendo le radici di ciascuna vite nelle diverse soluzioni per 25 minuti (Figura 11) ad eccezione dei controlli non trattati. Il FoAI è stato utilizzato alla dose consigliata in etichetta pari a 2,5 gr/l. Il campionamento è stato eseguito prelevando la terza/quarta foglia apicale di ciascun germoglio da ogni replica di ogni tesi ai tempi 16 (T1), 26 (T2) e 36 (T3) ore post trattamento. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.

### **1.3.2. Estrazione di RNA**

L'RNA totale è stato estratto seguendo il protocollo Czotter *et al.*, 2018. In particolare, per ciascun campione, 200 mg di foglia sono stati macerati in azoto liquido e addizionati di 850 µl di tampone [2% CTAB ("cetyltrimethylammonium bromide"), 2.5% PVP-40 ("polyvinyl pyrrolidone"), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8.0), 2 M NaCl], precedentemente scaldato a 65°C e addizionato di 17 µl 2% β-mercaptoetanol. La sospensione ottenuta è stata vortexata, incubata per 10 minuti a 65°C, e dopo essere stata addizionata di 850 µl di soluzione cloroformio-alcool isoamilico (24:1), è stata centrifugata per 10 minuti a 10.000 rpm. Il sopranatante è stato trasferito in nuovi tubi Eppendorf (2 ml) ed è stato addizionato di 800 µl di soluzione cloroformio-alcool isoamilico (24:1), come descritto in precedenza. Dopo aver ripetuto l'operazione due volte, il sopranatante è stato trasferito in nuovi tubi e mescolato per inversione con 250 µl 9 M LiCl. I tubi sono stati lasciati in incubazione in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugati per 20 minuti a 13.000 rpm. Il "pellet" ottenuto è stato risospeso in 450 µl di tampone SSTE [0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 1 M NaCl], precedentemente scaldato a 65°C e successivamente sono stati aggiunti 450 µl di soluzione cloroformio-alcool isoamilico (24:1). Dopo centrifuga di 10 minuti a 10.000 rpm, il sopranatante è stato trasferito in nuovi tubi, addizionato con 280 µl di isopropanolo e 30 µl acetato di sodio 4 M, ed incubato per 10 minuti a temperatura ambiente. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto due volte, prima di una centrifugazione per 20 minuti a 13.000 rpm. Il "pellet" finale è stato lavato in etanolo 70% (1 ml) e centrifugato per 5 minuti a 13.000 rpm, prima di essere asciugato e risospeso in 50 µl di acqua distillata sterile esente da nucleasi .

### **1.3.3. Analisi qRT-PCR**

I protocolli utilizzati per verificare la qualità e la quantità degli acidi nucleici estratti, per la retrotrascrittasi e le successive amplificazioni mediante Real Time PCR sono gli stessi descritti precedentemente (Capitolo 2, paragrafi 1.3.3. - 1.3.4.).

Allo scopo di verificare i risultati ottenuti nell'esperimento sui germogli di *C. roseus* sono stati selezionati per l'analisi di espressione genica in vite, alcuni geni coinvolti nelle medesime vie metaboliche (Tabella 9).

Gene bersaglio	Numero di accesso GenBank
Fenilalanina ammonio liasi ( <i>VvPAL1</i> )	X75967
Calcone sintasi 1 ( <i>CrCHS</i> )	AB015872
Calcone sintasi 2 ( <i>CrCHS</i> )	AB066275
Calcone sintasi 3 ( <i>CrCHS</i> )	AB066274
Stilbene sintasi ( <i>VvSTS</i> )	AF274281
Actina ( <i>VvACT</i> )	TC30205
Ubiquitina ( <i>VvUbiquitin1</i> )	TC32075
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi ( <i>VvGAPDH</i> )	CB973647

**Tabella 9.** Geni selezionati per lo studio di espressione genica in Vite

I “primers” utilizzati sono stati selezionati mediante un’attenta ricerca bibliografica e controllati mediante l’ausilio del programma Amplify 3 (Engels, 1993; Tabella 10).

Gene	"Primer"	Sequenza 5'-3'	Bibliografia
<i>VvPAL1</i>	Forward	TGCTGACTGGTGAAAAGGTG	Belhadj <i>et al.</i> , 2008
	Reverse	CGTTCCAAGCACTGAGACAA	
<i>VvCHS1</i>	Forward	AGCCAGTGAAGCAGGTAGCC	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
	Reverse	GTGATCCGGAAGTAGTAAT	
<i>VvCHS2</i>	Forward	TCTGAGCGAGTATGGGAACA	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
	Reverse	AGGGTAGCTGCGTAGGTTGG	
<i>VvCHS3</i>	Forward	GTTTCGGACCAGGGCTCACT	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
	Reverse	GGCAAGTAAAGTGGAAACAG	
<i>VvSTS</i>	Forward	GTGGGGCTCACCTTTCATT	Belhadj <i>et al.</i> , 2008
	Reverse	CTGGGTGAGCAATCCAAAAT	
<i>VvACT</i>	Forward	TCAGCACTTCCAGCAGATG	Belhadj <i>et al.</i> , 2008
	Reverse	TAGGGCAGGGCTTCTTTCT	
<i>VvUBQ1</i>	Forward	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	Bogs <i>et al.</i> , 2005
	Reverse	AACCTCCAATCCAGTCATCTAC	
<i>VvGAPDH</i>	Forward	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	Reid <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	CCACAGACTTCATCGGTGACA	

**Tabella 10.** Sequenze dei "primers" utilizzati per l'amplificazione dei geni "target"

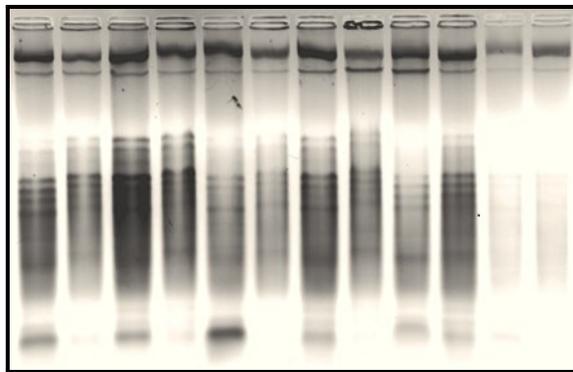
### 1.3.4. Analisi dei risultati ottenuti mediante qRT-PCR

L’analisi dei dati ottenuti mediante qRT-PCR è stata eseguita come descritto nel Capitolo 1, paragrafo 1.3.6. In questo caso le medie dei livelli di trascrizione di tutti i geni analizzati sono state normalizzate mediante l’impiego di tre geni di riferimento come controlli interni (actina, ubiquitina e gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi).

## 2. RISULTATI

### 2.1. Estrazione degli acidi nucleici

Attraverso l'utilizzo del protocollo di estrazione Czotter *et al.* (2018) sono stati ottenuti mediamente ~ 150 ng/ $\mu$ l di RNA da ogni singolo campione fogliare con rapporti di assorbanza sempre molto vicini a 2. I campioni che si discostavano dai valori di concentrazione media sono stati estratti più volte sino all'ottenimento dei parametri desiderati. La qualità degli acidi nucleici estratti è stata valutata mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% TAE (Figura 12).



**Figura 12.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% TAE di RNA estratto da una serie di viti cv. Chardonnay.

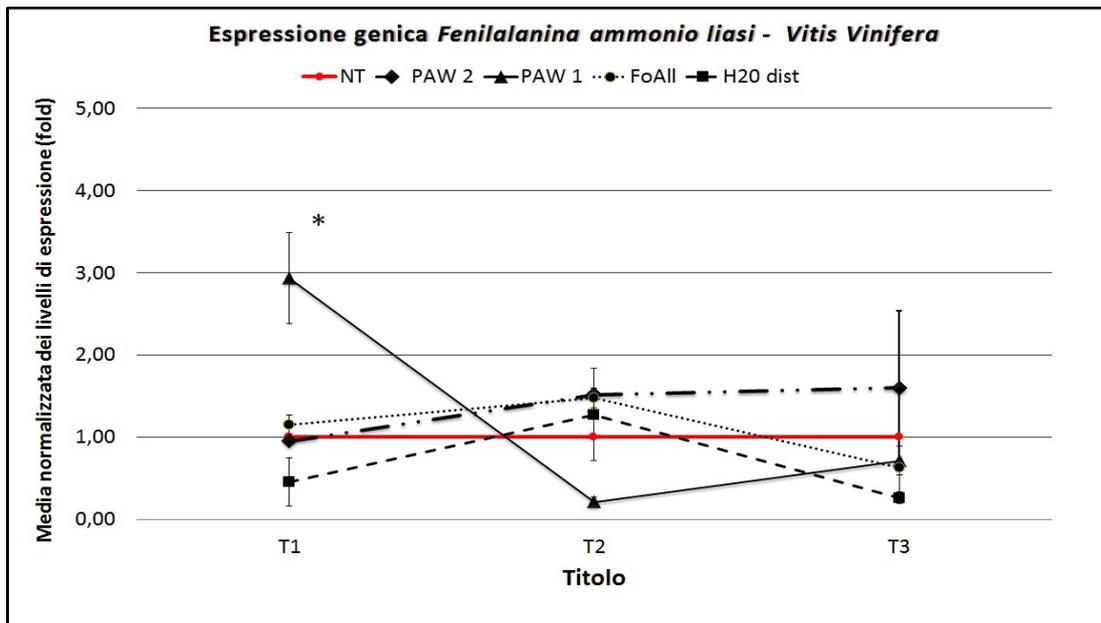
### 2.2. Analisi trascrizionale dei geni di difesa

I geni utilizzati come controlli interni ossia actina, ubiquitina e gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi si sono confermati geni di riferimento molto affidabili evidenziando livelli di espressione molto simili tra le tesi analizzate (PAW1, PAW2, FoA1, ddH<sub>2</sub>O e NT.). Le medie dei livelli di trascrizione di tutti i geni analizzati (Ct, "cycle threshold") sono state normalizzate singolarmente a quelle rilevate su ogni gene di riferimento e successivamente anche alla loro media geometrica. Come nell'esperimento precedente, l'utilizzo di un controllo negativo, ossia della tesi trattata con acqua distillata sterile deionizzata, sottoposta alle stesse modalità di trattamento impiegate nelle altre tesi ha permesso di valutare le reali risposte indotte nelle piante, escludendo la possibilità che le differenze riscontrate potessero essere dipese da fenomeni di stress indotti dalla modalità di trattamento. Per questo motivo è stato incluso negli studi il controllo trattato con acqua in modo da garantire che i risultati ottenuti riflettessero accuratamente la risposta della pianta al solo trattamento (Smart *et al.*,

2003). Infine, le curve di dissociazione ottenute per ogni singolo gene analizzato hanno confermato la specificità e l'efficienza dei "primers" impiegati nell'analisi.

### 2.2.1. Gene fenilalanina ammonio liasi

I risultati ottenuti dall'analisi di espressione genica eseguita sulla sequenza omologa a quella codificante fenilalanina ammonio liasi (*VvPAL1*) dimostrano la sua espressione differenziale nella tesi trattata con PAW1. I livelli trascrizionali delle piante appartenenti alla tesi PAW1, evidenziano differenze statisticamente significative a T1 (16 ore post trattamento) rispetto a tutti gli altri gruppi in esame; la trascrizione del gene fenilalanina ammonio liasi, in suddetta tesi, è risultata essere 2,9 volte superiore rispetto a quella di tutte le altre prove (Grafico 11).



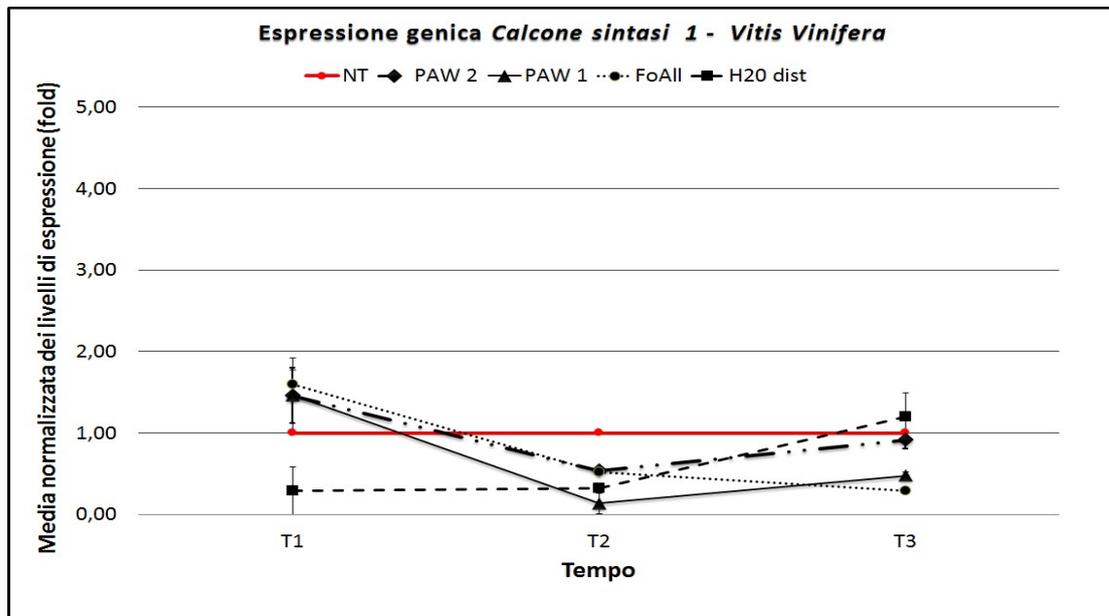
**Grafico 11.** Cinetica di espressione del gene *VvPAL1* in foglie di *V. vinifera* cv. Chardonnay dopo trattamento mediante bagno radicale con: PAW1 (triangolo nero); PAW2 (rombo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *VvPAL1* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T1= 16 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 26 ore d.t.; T3 = 36 ore d.t.; (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)

Al rilievo successivo, eseguito a 26 ore dal trattamento, i livelli trascrizionali del gene *VvPAL1* erano rientrati nella normalità confermando l'azione rapida ma poco duratura di PAW1 su questo gene. Comportamento molto diverso è stato invece registrato nella tesi PAW2 ove, la trascrizione del gene *VvPAL1* sembra aumentare, seppur molto lievemente,

durante i tre tempi analizzati. Mediante test "T-student" è stato possibile determinare come i valori della tesi PAW2 al T3 (36 ore p.t.) risultino statisticamente significativi rispetto al controllo trattato ddH<sub>2</sub>O evidenziando valori di espressione superiori di 1,6 unità (Grafico 11).

### 2.2.2. Gene calcione sintasi

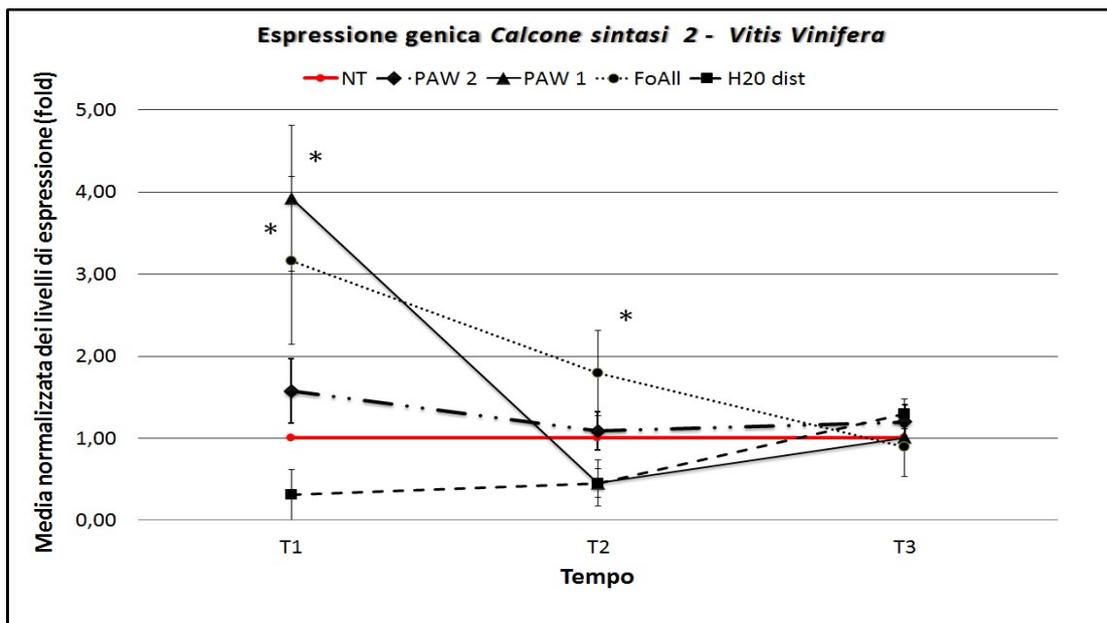
Allo scopo di verificare con accuratezza l'effetto del trattamento a carico della via biosintetica dei flavonoidi, sono state analizzate le espressioni di tutte e tre le forme isogeniche della calcione sintasi in vite ossia: calcione sintasi 1 (*CHS1*), calcione sintasi 2 (*CHS2*) e calcione sintasi 3 (*CHS3*).



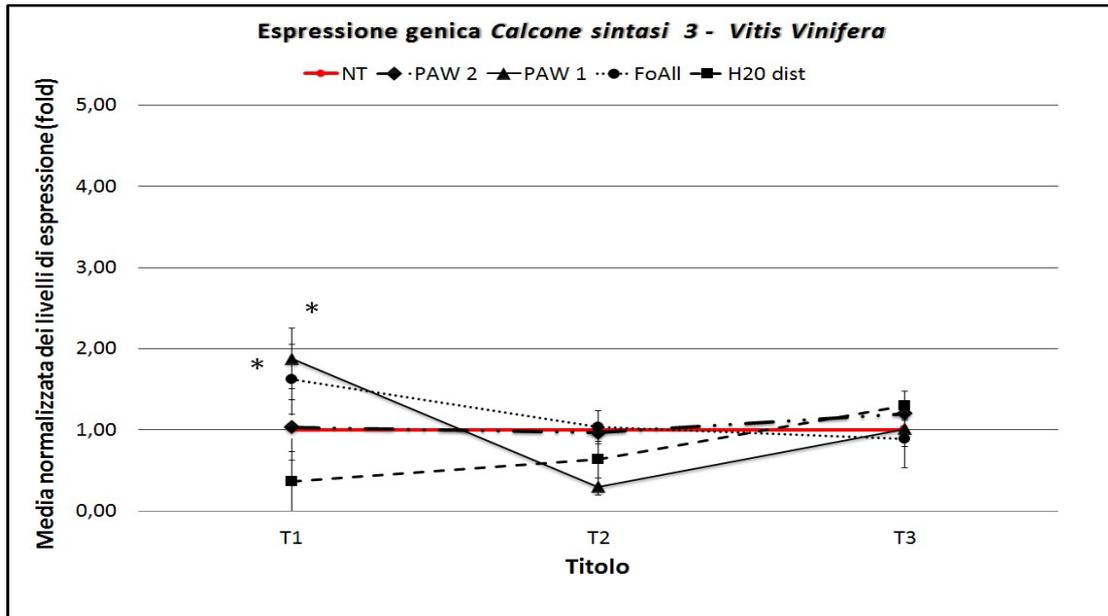
**Grafico 12.** Cinetica di espressione del gene *VvCHS1* in foglie di *V. vinifera* cv. Chardonnay dopo trattamento mediante bagno radicale con: PAW1 (triangolo nero); PAW2 (rombo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *VvCHS1* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T1= 16 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 26 ore d.t.; T3 = 36 ore d.t.

L'espressione del frammento del gene putativo per calcione sintasi 1 non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra le tesi analizzate manifestando, per tutti e tre i tempi di analisi, livelli di trascrizione pressochè identici ai controlli non trattati (Grafico 12). Differenze significative sono state invece riscontrate a carico di calcione sintasi 2 e,

seppur in forma molto ridotta, di calcione sintasi 3. In particolare le tesi PAW1 e FoAl hanno evidenziato, al tempo 1 (16 ore p.t.) livelli di trascrizione per il gene *CHS2* rispettivamente 3,9 e 3,16 volte superiori rispetto ai controlli non trattati e 4,6 e 3,8 volte maggiori rispetto alla tesi trattata con acqua distillata (Grafico 13). A 26 ore dal trattamento i livelli di espressione nella tesi PAW1 si sono stabilizzati sugli stessi valori rinvenuti nei controlli non trattati. Un effetto più durevole nel tempo è stato riscontrato nelle viti trattate con FoAl ove, a seguito del picco di espressione al tempo 1, sono stati rilevati livelli significativamente più alti anche al tempo 2 (26 ore p.t.). Seppur la cinetica di espressione tenda a diminuire a seguito del picco registrato al tempo 1, la tesi FoAl evidenzia a 26 ore dal trattamento livelli di trascrizione pari a 1,8 volte i controlli non trattati e 2,2 volte la tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O (Grafico 13). Al tempo 3 (36 ore p.t.) tutte le tesi analizzate evidenziavano livelli di espressione comparabili con quelli rilevati nei controlli non trattati (Grafico 13).



**Grafico 13.** Cinetica di espressione del gene *VvCHS2* in foglie di *V. vinifera* cv. Chardonnay dopo trattamento mediante bagno radicale con: PAW1 (triangolo nero); PAW2 (rombo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *VvCHS2* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T1= 16 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 26 ore d.t.; T3 = 36 ore d.t.; (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)



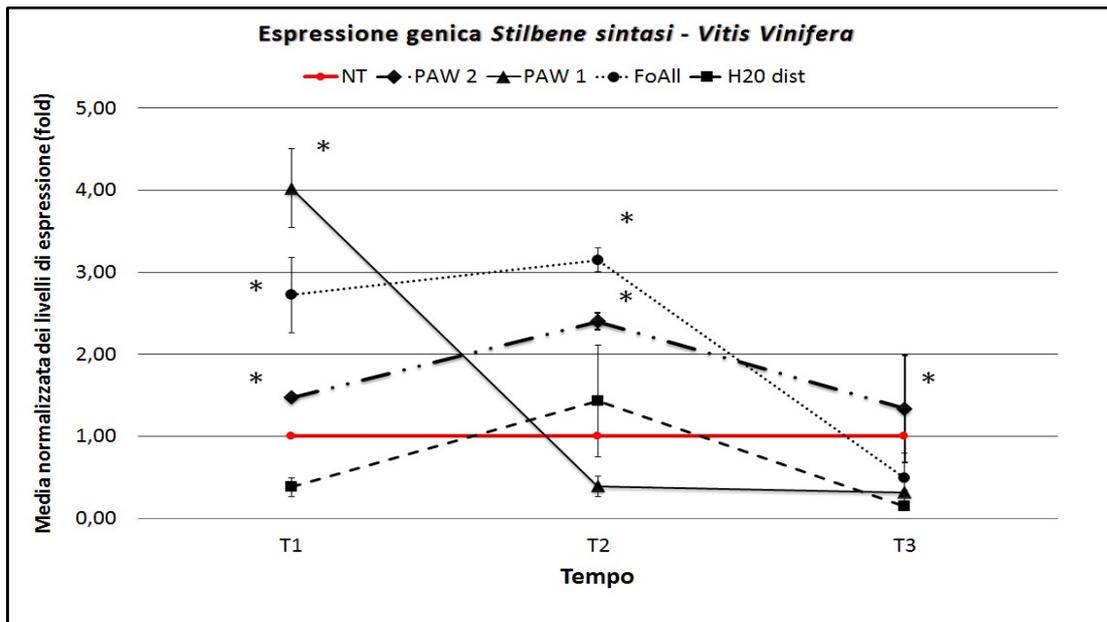
**Grafico 14.** Cinetica di espressione del gene *VvCHS3* in foglie di *V. vinifera* cv. Chardonnay dopo trattamento mediante bagno radicale con: PAW1 (triangolo nero); PAW2 (rombo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *VvCHS3* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T1= 16 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 26 ore d.t.; T3 = 36 ore d.t.; (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)

Infine, l'analisi condotta sul frammento di sequenza corrispondente a calcione sintasi 3 evidenzia livelli trascrizionali leggermente più elevati al tempo 1 (16 ore p.t.) nelle tesi PAW1 e FoAl. Sebbene i valori siano risultati statisticamente significativi rispetto a quelli degli altri gruppi, l'incremento di espressione rilevato nelle due tesi (PAW1, FoAl) è veramente minimo registrando rispettivamente un aumento pari a 1,9 e 1,62 volte i controlli non trattati e 2,5 e 2,22 volte la tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O (Grafico 14). I risultati ottenuti nei due tempi di analisi successivi non hanno invece evidenziato alcuna differenza tra le tesi in esame.

### 2.2.3. Gene stilbene sintasi

Dagli esperimenti qRT-PCR si è potuto evidenziare come la sequenza omologa a stilbene sintasi (*VvSTS*) sia modulata differenzialmente nelle varie tesi sottoposte ad analisi. Il valore di espressione più elevato viene espresso nella tesi PAW1 al tempo 1 (16 ore p.t.), ove si registrano livelli di trascrizione pari a 4 volte i controlli non trattati e 4,6 volte la tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O (Grafico 15). Al picco iniziale segue una rapida diminuzione dei trascritti al

tempo 2 (26 ore p.t.) confermata poi anche dal rilievo successivo effettuato a 36 ore p.t. (Grafico 15). Il trend così ottenuto rispecchia le cinetiche di espressione determinate precedentemente sia per il gene *VvPAL1* che per il gene *CHS2* ove, dopo di un picco iniziale si evidenzia una rapida diminuzione dei relativi livelli di espressione.



**Grafico 15.** Cinetica di espressione del gene *VvSTS* in foglie di *V. vinifera* cv. Chardonnay dopo trattamento mediante bagno radicale con: PAW1 (triangolo nero); PAW2 (rombo nero); FoAl (cerchio nero); ddH<sub>2</sub>O (quadrato nero). La linea rossa esprime il valore medio di espressione rilevato nei controlli non trattati. Il grafico mostra l'induzione del gene *VvSTS* ad ogni tempo di analisi con il relativo errore standard ( $\pm$ SE). I tempi selezionati sono: T1= 16 ore dopo il trattamento (d.t.); T2 = 26 ore d.t.; T3 = 36 ore d.t.; (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .)

Comportamento diverso è stato riscontrato per le altre tesi in esame le quali, sebbene raggiungendo livelli di espressione diversi, hanno manifestato un trend abbastanza uniforme. In particolare, per la tesi trattata con PAW2 sono state riscontrate differenze statisticamente significative in tutti i tempi di analisi; al tempo 1 (16 ore p.t.) i livelli dei trascritti del gene *VvSTS* sono risultati 1,5 volte superiori a quelli dei controlli non trattati e 2,1 volte maggiori a quelli della tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O (Grafico 15). Anche al tempo 2 (26 ore p.t.) l'espressione nella tesi PAW2 era superiore di 2,4 e 3,1 unità se comparata rispettivamente ai controlli non trattati e alla tesi ddH<sub>2</sub>O. Nell'ultimo tempo di analisi (36 ore p.t.) i valori trascrizionali determinati nella tesi PAW2, sebbene in modo molto ridotto, si confermavano superiori alla tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O di 1,3 unità. Cinetica di espressione molto simile è stata

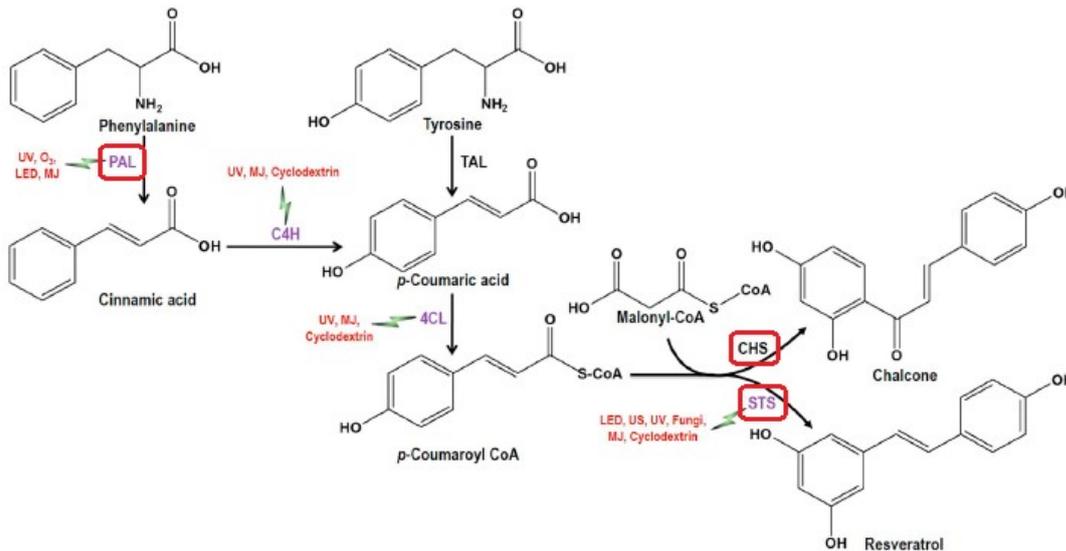
osservata anche nelle viti trattate con FoAl; in questo caso sono stati determinati aumenti significativi dei livelli dei trascritti al tempo 1, ove la suddetta tesi evidenziava espressioni pari a 2,7 e 3,3 volte i controlli non trattati e la tesi ddH<sub>2</sub>O, ed anche al tempo 2 dove sono stati registrati rapporti di espressione leggermente superiori ai precedenti ossi pari a 3,1 e 3,7 rispettivamente (Grafico 15).

### 3. DISCUSSIONE

Allo scopo di verificare e confermare i risultati ottenuti nell'esperimento precedente ove, germogli micropropagati di *C. roseus* esposti a PAW1 hanno evidenziato una sovraespressione dei geni per callosio sintasi, fenilalanina ammonio liasi, strictosidina- $\beta$ -glucosidasi e parzialmente deacetilvondolina-O-acetiltransferasi, si è verificata l'attività di PAW su viti cv. Chardonnay *in vivo*. Il primo gene selezionato *VvPAL1*, codifica fenilalanina ammonio liasi enzima precursore della ramificazione metabolica tra metabolismo primario (via metabolica dello scichimato; Hermann,1995) e metabolismo secondario (via metabolica dei fenilpropanoidi; Harborne, 1998). Questo enzima stacca il gruppo amminico dalla fenilalanina e catalizza la formazione di un doppio legame carbonio-carbonio, producendo acido cinnamico; poi la cinnammato-4-idrossilasi lega un ossidrile in posizione 4 dell'anello benzenico; segue la sostituzione dell'OH del gruppo carbossilico con un sulfidril-coenzima A ad opera della CoA ligasi; a questo punto la via biosintetica si dirama verso la formazione del resveratrolo catalizzata da stilbene sintasi (*STS*) o dei flavonoidi catalizzata da calcione sintasi (*CHS*) (Soleas *et al.*, 1997; Schröder, 1999; Jeandet *et al.*, 2002). L'attività di stilbene sintasi (*STS*) è solitamente oltre 20 volte maggiore di quella di calcione sintasi (*CHS*), ma mentre quest'ultima è costitutivamente attiva, *STS* deve essere indotta. Una volta attivata la via, la sintesi di stilbeni generalmente prevale su quella di flavonoidi (Melchior & Kindl, 1991). La reazione di condensazione catalizzata da *STS* utilizza 3 malonil-CoA (ottenuto da allungamento di unità di acetil CoA) e 1 *p*-cumaroil-CoA (da fenilalanina via *PAL*) per formare una molecola di *trans*-resveratrolo (Soleas *et al.*, 1997; Schröder, 1999; Jeandet *et al.*, 2002; Figura 13).

Questa via metabolica è stata ampiamente studiata in vite in quanto contribuisce alla pigmentazione dei fiori, frutti, semi e foglie ed è coinvolta in diversi processi fisiologici e

biochimici quali la protezione dai raggi UV, l'attrazione nei confronti degli insetti, la produzione di sostanze di difesa verso gli erbivori e verso i principali patogeni (Koes *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2009).



**Figura 13.** Fasi iniziali della via biosintetica dei fenilpropanoidi in vite che porta alla produzione della fitoalessina resveratrolo. Gli enzimi coinvolti nell'analisi di espressione genica sono cerchiati in rosso; *PAL*: fenilalanina ammonio liasi; *CHS*: calcone sintasi; *STS*: stilbene sintasi (da Hasan *et al.*, 2017).

Il resveratrolo ed i suoi derivati come ad esempio 3- e a-viniferina, pterostilbene e piceatannolo rappresentano le principali fitoalessine in vite (Adrian *et al.*, 1997; Pezet *et al.*, 2004). Diversi studi hanno dimostrato come queste molecole vengano sintetizzate in vite in risposta ai principali patogeni fungini quali *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* (Fung *et al.*, 2008; Schnee *et al.*, 2008; Adrian *et al.*, 1997; Langcake *et al.*, 1976; Langcake *et al.*, 1979; Bézier *et al.*, 2002). Un meccanismo simile è stato osservato anche in viti sintomatiche infette da BN e viti “recovered” le quali, a differenza dei controlli non infetti, manifestavano una sovraespressione della via metabolica dei fenilpropanoidi ed in particolare del gene codificante fenilalanina ammonio liasi (*PAL*) e calcone sintasi (*CHS*) (Landi *et al.*, 2011). Questi composti, oltre ad essere fondamentali nell'indurre meccanismi di difesa nelle piante, manifestano una spiccata attività antiossidante che li rende molecole molto studiate nella medicina umana. Il piceatannolo ad esempio, è in grado di inibire la proliferazione di cellule tumorali promuovendo l'apoptosi ed arrestando il ciclo cellulare. È stato ipotizzato che gli effetti antiproliferativi del resveratrolo siano il risultato di una

conversione a piceatannolo ad opera del citocromo P450 1B1, espresso nelle cellule tumorali (King *et al.*, 2006). Il resveratrolo possiede proprietà antiossidanti tali da poter prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari, come l'arteriosclerosi, modulando il metabolismo dei lipidi, inibendo l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e l'aggregazione delle placche arteriosclerotiche (Soleas *et al.*, 1997; Lin & Tsai, 1999; Frémont, 2000).

I risultati ottenuti dall'analisi qRT-PCR hanno rilevato che a seguito del trattamento con PAW1 vi è una sovraespressione dei geni *VvPAL1*, *VvCHS2*, *VvSTS* e parzialmente del gene *VvCHS3*. In particolare questi geni hanno evidenziato un aumento dei trascritti al tempo 1 (16 ore post-trattamento) per poi rientrare entro valori non significativi al rilievo successivo (26 ore p.t.). L'espressione relativa del gene *VvPAL1* ad esempio è risultata essere 2,9 volte superiore rispetto ai controlli non trattati mentre i geni *VvCHS2* e *VvSTS* hanno espresso valori rispettivamente superiori di 3,9, e 4 unità. In merito all'analisi svolta sul gene codificante calcione sintasi 3 le differenze riscontrate, sebbene significative, si sono attestate su valori bassi evidenziando una differenza sui controlli pari a 1,9 unità. Esaminando le risposte dei diversi geni analizzati si evince come il trattamento con PAW1 sia riuscito ad attivare, sebbene per un intervallo di tempo limitato, i principali geni coinvolti nella via biosintetica dei fenilpropanoidi in vite. Sedici ore dopo l'esposizione le piante manifestavano livelli di trascrizione superiori di ben 4 unità rispetto ai controlli per i geni *VvCHS2* e *VvSTS* mentre il gene *VvPAL1* evidenziava un'espressione 2,9 volte maggiore.

Il comportamento riscontrato in vite risulta in accordo con quanto riscontrato nell'esperimento precedente ove, i germogli micropropagati di *C. roseus* a seguito di trattamento con PAW1 evidenziavano valori di espressione superiori per il gene *CrPAL* al tempo 2 e successivamente anche per il gene codificante strictosidina- $\beta$ -glucosidasi. Test condotti su colture cellulari di vite hanno evidenziato come la somministrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esogena provochi nei tessuti una sovraespressione dei geni *PAL* e *STS* mentre sembra limitare i livelli di trascrizione di calcione sintasi (Olazabal *et al.*, 2014). Risultati simili sono stati ottenuti anche a seguito di trattamento con metil-jasmonato ove è stata registrata un'attività maggiore del gene *PAL* e *STS* nelle colture cellulari di vite (Olazabal *et al.*, 2014; Belhadj *et al.*, 2008).

I diversi livelli di espressione rinvenuti per le tre isoforme geniche codificanti calcione sintasi, sembrano dovuti al fatto che questo enzima è controllato da famiglie multigeniche

differenzialmente regolate a livello trascrizionale (Yamamoto *et al.*, 2002; Durbin *et al.*, 2000). Studi filogenetici hanno infatti evidenziato come la sequenza aminoacidica del gene *CHS1* e del gene *CHS2* formino un “cluster” divergente rispetto all’isoforma *CHS3* (Yamamoto *et al.*, 2002). Inoltre, è stato dimostrato come l’mRNA relativo a *CHS3* tende ad accumularsi maggiormente nell'epidermide degli acini delle varietà a bacca rossa durante la loro colorazione mentre l’mRNA dei geni *CHS1* e *CHS2* viene espresso principalmente in foglie e bacche delle varietà bianche (Yamamoto *et al.*, 2002). Questo potrebbe parzialmente spiegare i risultati ottenuti nell’esperimento ove, la maggior espressione è stata determinata a carico del gene *CHS2*, una delle due isoforme più espresse nelle varietà di uva a bacca bianca. I risultati ottenuti sembrano confermare quanto visto nell’esperimento precedente avvalorando le ipotesi fatte sui possibili meccanismi d’azione della soluzione PAW1 (vedi Capitolo1, paragrafo 3). La presenza in soluzione acida di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> anche in questo caso ha stimolato la trascrizione del gene *PAL* con conseguente attivazione dei geni presenti a valle ossia stilbene sintasi (*STS*) e calcone sintasi (*CHS*).

Le cinetiche di espressione ottenute a seguito del trattamento con PAW2 sono risultate invece molto diverse. In questo caso, seppure siano state determinate differenze significative rispetto agli altri gruppi in analisi, nessuno dei geni analizzati ha evidenziato un picco di espressione. L’analisi eseguita sulla sequenza codificante fenilalanina ammonio liasi esprime livelli di trascrizione lievemente maggiori ai controlli non trattati durante tutti i tempi selezionati senza però evidenziare differenze statisticamente significative tra i gruppi. Unica differenza significativa è stata ottenuta mediante analisi con "T-student" al tempo 3 (36 ore p.t.) comparando i valori della tesi PAW2 con quelli del trattato ddH<sub>2</sub>O. Anche per quanto riguarda le tre isoforme geniche codificanti calcone sintasi non sono state determinate, in nessun tempo analizzato, differenze significative rispetto ai controlli non trattati e alla tesi trattata ddH<sub>2</sub>O. L’unico gene ad aver manifestato una lieve espressione a seguito del trattamento con PAW2 è risultato essere stilbene sintasi; in questo caso sono state verificate differenze significative in tutti e tre i tempi di analisi ove la tesi PAW2 ha sempre mantenuto livelli pari a 2 volte la tesi trattata ddH<sub>2</sub>O. L’effetto di PAW2 a carico del gene *STS*, sebbene appaia molto limitato, evidenzia una persistenza maggiore rispetto a quello generato da PAW1. Questo comportamento è probabilmente da mettere in relazione alle diverse composizioni chimiche delle due soluzioni; il pH quasi neutro della soluzione PAW2

conferisce infatti maggiore stabilità ai composti in essa presente limitando le reazioni tra perossidi e nitriti e preservando la presenza di quest'ultimi per un arco temporale maggiore. D'altra parte, il pH acido della soluzione PAW1 rende fortemente instabile e reattiva la soluzione generando nella pianta un segnale più forte ma al contempo molto breve. Il maggior stress ossidativo generato dalla soluzione PAW1 a carico dei tessuti vegetali potrebbe aver attivato la trascrizione del gene *VvPAL* (Qian *et al.*, 2004) innescando la via metabolica che porta alla sintesi degli stilbeni, composti abili nella neutralizzazione delle forme reattive dell'ossigeno viste le loro spiccate proprietà antiossidanti (Olazabal *et al.*, 2014). Studi condotti da Bais *et al.*, 2000 e Fritzemeier *et al.*, 1981 evidenziano come, per ottenere un'efficiente attivazione della via biosintetica degli stilbeni, sia necessaria anche l'espressione coordinata degli enzimi presenti a monte del "pathway", tra cui fenilalanina ammonio liasi. Suddetta considerazione avvalorata l'ipotesi che l'effetto della soluzione PAW1, inducendo la contemporanea sovra-espressione dei geni codificanti la fenilalanina ammonio liasi, la calcone sintasi e la stilbene sintasi possa generare un accumulo di stilbeni in vite.

## CAPITOLO 3

---

### **Analisi di espressione dei miRNAs nell'interazione pianta-fitoplasma ed a seguito di trattamento con PAW in piante di *C.***

#### ***roseus***

## **1. MATERIALI E METODI**

### **1.1. Acqua attivata al plasma**

Alla luce dei risultati ottenuti nelle prove condotte in precedenza, nel seguente esperimento sono stati investigati solamente i possibili effetti, a livello post trascrizionale, della soluzione denominata PAW1 (capitolo 1, paragrafo 1.1.) in piante di *C. roseus*.

### **1.2. Preparazione del materiale vegetale**

Con l'obiettivo di approfondire i risultati ottenuti dagli studi di espressione genica in tempo reale, sia in termini di interazione pianta fitoplasma, sia in termini di effetto del trattamento PAW1, si è deciso di svolgere la prova sugli stessi cloni di *C. roseus* a fiore bianco, mantenuti precedentemente in micropropagazione *in vitro* e utilizzati nel primo esperimento (capitolo 1, paragrafo 1.2.) nel primo caso, e cloni di *C. roseus* sani a fiore rosa nel secondo esperimento. In questo modo è stato possibile eseguire ambo le prove su piante con il medesimo patrimonio genetico mantenendo invariato il sistema pianta-patogeno. Per la prova inerente l'effetto della soluzione PAW1 sulla pianta, 6 piantine sane sono state selezionate e successivamente poste in vaso per ottenere 3 repliche biologiche trattate con PAW1 e tre repliche biologiche da utilizzare come controllo trattato acqua (ddH<sub>2</sub>O). Per la prova inerente lo studio di interazione pianta-fitoplasma sono state selezionate, e successivamente poste in vaso, piantine micropropagate di *C. roseus* infette con il fitoplasma *hydrangea* 35 (16SrI-B) e manifestanti due diverse sintomatologie: fillodia e giallumi e scopazzi (witches' broom). Inoltre, sono state scelte alcune piantine sane come controllo della prova. Le piante sono state monitorate per i due mesi seguenti allo scopo di individuare quelle con più chiara e accentuata sintomatologia. Trascorsi 90 giorni sono state selezionate per l'analisi tre piante infette manifestanti sintomi da fillodia (PH), tre piante infette con

evidenti espressioni da scopazzi (WB) e tre piante sane come controllo (Figura 14; Tabella 12). Per verificare la presenza del patogeno nelle piante selezionate si è proceduto all'estrazione del loro DNA mediante protocollo cloroformio/fenolo (Prince *et al.*, 1993; appendice 1) e successiva analisi PCR mediante "primers" R16F2n/R2 (Gundersen e Lee, 1996) amplificanti un frammento di circa 1200 nucleotidi del gene ribosomico 16Sr (appendice 2). Infine i campioni vegetali, comprendenti sia foglie che steli, sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.



**Figura 14.** Piantine di *C. rosues* (L.) G. Don prelevate dalla collezione in micropropagazione e poste in vaso. A) pianta di *C. rosues* infetta con il fitoplasma hydrangea 35 (16SrI-B) e manifestante fillodia; B) pianta di *C. roseus* infetta con il fitoplasma hydrangea 35 con sintomi da scopazzi; C) pianta di *C. roseus* sana.

### 1.2.1. Trattamento e campionamento

Le piante di *C. roseus* poste in vaso sono state utilizzate per valutare e quantificare i livelli di miRNAs nelle diverse tesi selezionate. La prima prova ha avuto l'obiettivo di verificare se il trattamento con PAW1 modifichi a livello post-trascrizionale il comportamento delle piante, comparando le tipologie e le quantità di miRNAs presenti nella tesi trattata con PAW1 e nella tesi di controllo trattata con ddH<sub>2</sub>O. Al raggiungimento di una determinata soglia di crescita, atta a consentire un buon assorbimento fogliare (~ 20 cm), le piante sono state dapprima suddivise nei due gruppi di appartenenza (PAW1, ddH<sub>2</sub>O) e successivamente trattate per immersione per 25 minuti nelle rispettive soluzioni (Figura 15). Le piante sono state poi conservate in ambiente controllato (24 ± 2°C, fotoperiodo di 16 h di luce) per le successive 16 ore, successivamente è stato eseguito il campionamento prelevando gli steli, la

terza, quarta e quinta foglia di ogni germoglio da ogni replica di ogni tesi (Tabella 11). I campioni vegetali sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a - 80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.



Figura 15. Trattamento delle piante di *C. roseus* per immersione.

Studio	Tesi	Molecole attive	Volume*(ml)	n° di piante	Referenza
Effetto PAW	PAW1	ROS; RNS	650	3	Gruppo AlmaPlasma
	ddH <sub>2</sub> O	/	650	3	/

Tabella 11. Schema sperimentale dell'analisi miRNAs sull'effetto del trattamento PAW1; \* volume di soluzione utilizzato per singolo trattamento.

Studio	Tesi	n° di piante
Interazione pianta-fitoplasma	Infetta con sint. da fillodia (PH)	3
	Infetta con sint. da scopazzi (WB)	3
	Sana	3

Tabella 12. Schema sperimentale dell'analisi miRNAs dell'interazione pianta-fitoplasma.

### **1.3. Analisi dei livelli di espressione dei miRNAs**

Le analisi descritte nei prossimi paragrafi sono state eseguite presso il centro nazionale di ricerca e innovazione in agricoltura denominato NAIK (Nemzeti Agrarkutatási és Innovációs Központ) situato a Gödöllő (Ungheria) sotto la supervisione della dottoressa Éva Várallyay.

#### **1.3.1. Estrazione di RNA**

Al fine di massimizzare le rese dell'estrazione e limitare la denaturazione dell'RNA tutti i passaggi sotto descritti sono stati eseguiti in ghiaccio. Da ogni pianta sono stati prelevati circa 200 mg di foglie, che sono state macerate in mortaio con azoto liquido, addizionate di 600 µl di tampone di estrazione [2% SDS, 1x EB (1 M di glicina, 100 mM EDTA, 1 M NaCl), pH 9,5] e di un ugual volume di fenolo. Dopo centrifugazione a 15.000 rpm a temperatura ambiente per 5 min, è stata prelevata la fase acquosa che, a sua volta, è stata addizionata di 600 µl di fenolo-cloroformio (1:1) e ricentrifugata alla stessa velocità. La fase acquosa risultante è stata addizionata di 600 µl di cloroformio, centrifugata come sopra, e, dopo separazione delle fasi, è stata addizionata di 0,1 volumi di CH<sub>3</sub>COONa 4M e 2,2 volumi di etanolo assoluto freddo. I campioni così ottenuti sono stati mescolati più volte per inversione e incubati in ghiaccio per 10 minuti dopodichè la sospensione è stata centrifugata a 15.000 rpm a 4°C per 30 min. Il "pellet" ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, centrifugato per 3 minuti a 15.000 rpm, disidratato sotto vuoto ed infine risospeso in 30 µl di acqua MilliQ pure sterile (Thermo Fisher scientific, USA). Per ogni pianta analizzata sono state eseguite quattro estrazioni di RNA: due dai tessuti fogliari e due dagli steli; in questo modo è stato possibile ottenere un campione più rappresentativo per ciascuna pianta.

#### **1.3.2. Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto**

Per determinare la quantità di RNA estratto ciascun campione è stato valutato mediante Spettrofotometro Nanodrop 1.000 (Thermo Fisher Scientific, USA), in cui 1 µl di RNA è stato letto e quantificato alla lunghezza d'onda di 260 nm.

La qualità dei singoli estratti è stata controllata mediante corsa elettroforetica in gel 1,2 % TAE a 140 V ove per ogni singolo campione è stata caricata la miscela composta da 2 µl di RNA, 3 µl di H<sub>2</sub>O e 5 µl di colorante FDE [10 mg bromofenolo blu, 10 mg xilene cianolo in 10 ml di formaldeide, 200 µl 0,5 EDTA (pH 8.0)]. In questo caso 2 µl di etidio bromuro sono

stati aggiunti direttamente in fase di preparazione del gel. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato esposto alla luce di una lampada UV e successivamente fotografato mediante transilluminatore Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System a luce UV.

### **1.3.3. Preparazione della libreria di miRNAs**

La preparazione della libreria di "small RNA" (sRNA) per il sequenziamento Illumina si basa sull'utilizzo del Truseq® small RNA kit di Illumina (Illumina, San Diego, California, USA) e si divide principalmente in cinque fasi: purificazione della frazione di sRNA dall'RNA totale estratto, ancoraggio degli adattatori alla pozione 3' e 5', retrotrascrittasi, reazione di PCR e purificazione della libreria di sRNA ottenuta.

#### **1.3.3.1. Purificazione della frazione di sRNA dall'RNA estratto**

Per ottenere librerie genomiche di "small RNA" di qualità superiore e più rappresentative di ogni campione, è stato utilizzato un pool contenente 30 µg di RNA totale derivante dalle singole estrazioni effettuate da foglie e da steli dei singoli campioni. Il primo step della purificazione della frazione di "small RNA" dal pool di RNA totale di ciascun campione ha previsto la realizzazione di un gel denaturante 8% poliacrilamide in TBE contenente urea (appendice 4). Ottenuto il gel è stata eseguita una corsa elettroforetica a vuoto a 100 V per 30 minuti e successivamente si è proceduto pulendo ciascun pozzetto con una soluzione tampone 1xTBE. Parallelamente ciascun pool di RNA è stato addizionato con equivalente volume di colorante FDE [10 mg bromofenolo blu, 10 mg xilene cianolo in 10 ml di formaldeide, 200 µl 0,5 EDTA (pH 8.0)], denaturato a 65°C per 20 minuti e immediatamente posto in ghiaccio. Ogni singolo campione è stato dunque caricato nel gel di poliacrilamide ove è stata eseguita una corsa elettroforetica a voltaggio costante pari a 100 V per circa 1 ora e mezza. A questo punto la struttura è stata disassemblata ed il gel è stato immerso in 60 ml 1x TBE contenenti 3 µl di etidio bromuro 1% per circa 5 minuti. Controllato e visualizzato il gel mediante transilluminatore UV si è proceduto, mediante bisturi sterile, ad asportare la porzione di gel immediatamente sopra il colorante (15-30 nt) contenente tutta la frazione di sRNA. Attraverso l'utilizzo di un ago sterile, tubi Eppendorf da 0,5 ml sono stati dapprima forati sul fondo, posti all'interno di tubi microcentrifugabili da 2 ml, e caricati con la porzione di gel recisa precedentemente. I tubi sono stati centrifugati (Eppendorf 5427 R) alla

massima velocità a temperatura ambiente per due minuti controllando che tutto il gel fosse passato attraverso i fori. Rimosso il tubo Eppendorf da 0,5 ml sono stati aggiunti alla porzione di gel 400 µl di NaCl 0,3 M ed i tubi sono stati lasciati nell'agitatore a 4°C per tutta la notte allo scopo di eluire l'RNA. Il giorno seguente l'eluato e i residui di gel sono stati trasferiti nella colonnina dotata di filtro di cellulosa (Corning® Costar® Spin-X® centrifuge tube; Sigma-Aldrich) e centrifugati a 6.000 rpm per 2 minuti. Questo step è stato ripetuto una seconda volta dopodichè la colonnina contenente gli ultimi residui del gel è stata eliminata. E' stato aggiunto un egual volume di isopropanolo al 100% (circa 600-700 µl) e 1 µl di glycoblu (15 mg/ml glycoblu coprecipitante; Thermo Fisher, USA) e l'eluato è stato incubato a -70°C per tutta la notte. Il precipitato è stato quindi centrifugato alla massima velocità per 20 minuti a 4°C, il soprannatante è stato eliminato e il "pellet" ottenuto lavato due volte mediante 1 ml di etanolo freddo al 70%. Il "pellet" è stato disidratato sotto vuoto e successivamente risospeso in 12 µl di acqua ultrapura (Thermo Fisher Scientific, USA) mediante l'utilizzo di filtri tamponati.

### **1.3.3.2. Ancoraggio degli adattatori alla porzione 3' e 5'**

Questo passaggio è fondamentale perché consente, mediante l'utilizzo di questi adattatori, di discriminare i diversi campioni una volta sequenziati in base a sequenze index in grado di legarsi ad essi. Aliquote di 2,5 µl di RNA purificato sono state poste in un tubo Eppendorf, addizionate di 0,5 µl RNA adattatore 3' (RA3; Illumina, USA), successivamente poste per 2 minuti in un termociclatore (iQ5-Biorad) preriscaldato a 70°C e successivamente in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di 1 µl di "ligation buffer" (HML; Sigma Aldrich), 0,5 µl di inibitore della RNasi (Sigma Aldrich) e 0,5 µl di T4 RNA ligasi 2 (troncato; New England Biolabs, USA) il tutto è stato mescolato più volte e incubato per un'ora a 28°C. La reazione è terminata con l'aggiunta di 0,5 µl di "stop solution" (STP; Sigma Aldrich) e successiva incubazione a 28°C per 15 minuti; i campioni sono stati infine posti in ghiaccio per 10 minuti. Terminata la fase di appaiamento dell'adattatore al 3' si è proceduto con la fase di appaiamento al 5'. In un nuovo tubo Eppendorf sono stati aggiunti 0,5 µl di RNA adattatore 5' (RA5; Illumina) e il tutto è stato posto nel termociclatore a 70°C per due minuti. Il tubo è stato poi posto in ghiaccio e addizionato di una miscela contenente 0,5 µl di ATP 10 mM e 0,5 µl di T4 RNA ligase (non troncato; 5 U/µl, Life Technology, USA).

La soluzione così ottenuta, pari a 1,5 µl, è stata aggiunta alla miscela finale ottenuta nella fase precedente di appaiamento dell'adattatore 3' ottenendo un volume totale di 6 µl. La miscela totale (reazione di appaiamento 3'-5') è stata posta nuovamente a 28°C nel termociclatore per un'ora e infine lasciata in ghiaccio per le fasi successive.

### **1.3.3.3. Retrotrascrizione**

Il primo step ha previsto l'aggiunta nella miscela precedentemente ottenuta (reazione di appaiamento 3'-5') di 1 µl di "primer RT" (RTP; Illumina, USA); la soluzione è stata mescolata vigorosamente, posta a 70°C per 2 minuti e infine lasciata in ghiaccio. In un tubo Eppendorf a parte (0,2 ml) è stata preparata la miscela per la retrotrascrittasi composta da 1,1 µl di acqua ultrapura (Thermo Fisher Scientific, USA), 2,2 µl di tampone di reazione 5x, 0,55 µl della miscela dNTP 12,5 mM, 1,1 µl di inibitore RNasi e 1,1 µl di Revert Aid H-trascrittasi inversa (Thermo Fisher Scientific, USA). Dopo una breve centrifugazione la miscela così ottenuta è stata aggiunta alla reazione di appaiamento 3'-5' ottenendo una soluzione totale pari a 12,5 µl; il tutto è stato centrifugato e incubato a 50°C per un'ora e mantenuto in ghiaccio per le successive analisi o conservato -20°C se non usata immediatamente.

### **1.3.3.4. Reazione di PCR**

In un tubo Eppendorf nuovo (0,2 ml) è stata preparata la miscela di reazione composta da 4,25 µl di acqua MilliQ (Thermo Fisher Scientific USA), 12,5 µl di PCR mix (PML), 1 µl di RNA PCR "primer" (RP1) e 1 µl di RNA PCR "primer" index (RPIX) (TruSeq® small RNA library prep kit; Illumina, USA). In questo passaggio bisogna prestare particolare attenzione allo scopo di utilizzare index diversi per ogni libreria che verrà sequenziata nella stessa corsia, in modo che esse siano facilmente distinguibili una volta ottenute le sequenze. Ciascun index è composto da una diversa sequenza di 6 nucleotidi che permette di distinguere i diversi campioni una volta sequenziati. Dopo aver centrifugato e mescolato la miscela di reazione sono stati aggiunti i 6,25 µl di cDNA precedentemente ottenuti dalla reazione di trascrittasi inversa, ottenendo una soluzione totale pari a 25 µl. Il tutto è stato posto nel termociclatore impostato come segue: 30 secondi a 98°C, 16 cicli di amplificazione comprendenti 10 secondi a 98°C per la denaturazione, 30 secondi a 60°C per

l'appaiamento e 15 secondi a 72°C per la fase di amplificazione. La reazione è stata poi conclusa mediante incubazione a 72°C per 10 secondi. La libreria genomica così ottenuta, contenente la frazione degli "small RNA" amplificata, è ora pronta per essere purificata.

### **1.3.3.5. Purificazione della libreria di "small RNA"**

Il primo step, come in precedenza, ha previsto la preparazione del gel di poliacrilammide 8% in TBE; il gel è stato ottenuto come descritto in appendice 3 senza però, in questo caso, l'utilizzo di urea. E' stata eseguita una corsa a vuoto a 100 V per 30 minuti, sono stati puliti tutti i pozzetti mediante tampone 1xTBE e successivamente la miscela di PCR è stata addizionata di 5 µl di colorante Orange DNA (Thermo Fisher Scientific, USA) ottenendo un volume totale di 30 µl. Nel gel sono stati caricati due DNA "markers" di pesi molecolari differenti: 4 µl di DNA "ladder" 20 bp e 50 bp (Thermo Fisher Scientific, USA). La miscela di PCR addizionata del colorante "orange DNA" è stata dunque caricata nel mezzo del gel utilizzando due pozzetti (15 µl di miscela ciascuno). Per ogni campione analizzato è sempre stato utilizzato un gel diverso allo scopo di evitare possibili contaminazioni. Il gel è stato fatto correre a voltaggio costante di 100 V per circa due ore ossia fino a quando il colorante xilene cianolo non avesse raggiunto il fondo del gel. Finita la corsa la struttura è stata disassemblata e il gel è stato posto in una soluzione contenente 60 ml di 1xTBE e 3 µl di etidio bromuro 1% per 5 minuti. La porzione di gel contenente la frazione di "small RNA" (140-145 nt) è stata visualizzata mediante l'utilizzo di transilluminatore UV e successivamente asportata con bisturi sterile. Tale porzione, come in precedenza, è stata posta in tubi Eppendorf da 0,5 µl precedentemente forati più volte nel fondo e posti all'interno di un tubo da 2 ml. Dopo una centrifugazione di 4 min a 14.000 rpm, sono stati aggiunti 400 µl di NaCl 0,3 M e i tubi sono stati lasciati in agitatore a 4°C per tutta la notte. Il giorno successivo l'eluato è stato posto in una colonnina dotata di filtro di cellulosa (Corning® Costar® Spin-X® centrifuge tube; Sigma-Aldrich) e centrifugato a 6.000 rpm per 2 minuti. Dopo aver ripetuto questo passaggio una seconda volta è stato aggiunto 1 µl di glicoblue all'eluato ed il tutto è stato messo a precipitare mediante 1 ml di etanolo al 100%. I tubi sono stati lasciati a -70°C per tutta la notte e successivamente centrifugati alla massima velocità per 20 minuti; scartato il soprannatante il "pellet" è stato pulito per due volte mediante 1 ml di etanolo al 70%. Dopo centrifugazione a 13.400 rpm per 5 minuti il "pellet"

è stato disidratato sotto vuoto e risospeso in 12 µl di tampone 1xTE. La libreria genomica ottenuta è stata conservata a -20°C per il sequenziamento o -70°C per lunghi periodi.

#### **1.3.4. Sequenziamento e analisi delle sequenze**

Le librerie di "small RNA" sono state sequenziate mediante la piattaforma Illumina HiSeq2000 sRNA-seq (<http://support.illumina.com>). Le sequenze ottenute sono state analizzate ed elaborate mediante il programma CLC Genomics Workbench (v 11.0, CLCbio, Arhus, Danimarca). Inizialmente si è proceduto importando nel programma le sequenze in formato fastq, sono state controllate le qualità delle singole librerie e i valori delle letture, poi successivamente sono stati tagliati dalle sequenze le porzioni inerenti gli adattatori (index). A questo punto è stata generata la mappatura globale delle librerie, senza adattatori, che permette di valutare la qualità e la quantità delle letture. Le singole librerie sono state analizzate e comparate con il trascrittoma di *C. roseus* disponibile online (<http://nipgr.res.in/mjain.html?page=catharanthus>) impostando 1 solo mismatch come possibile differenza tra le sequenze in analisi. Terminato questo procedimento tutte le librerie sono state normalizzate sullo stesso valore in modo che le letture venissero rapportate tutte alla stessa quantità di sRNA. Successivamente, sempre mediante l'utilizzo del medesimo software, sono stati creati due esperimenti comparativi: uno per comparare le librerie ottenute dalle piante trattate con PAW1 e ddH<sub>2</sub>O e uno per comparare le librerie ottenute dalle piante manifestanti sintomi da fillodia, scopazzi e dai controlli sani. Ottenuti i file comparativi dei due esperimenti si è proceduto mediante l'analisi statistica dei dati; in entrambe le prove è stato eseguito il Baggerley's Test (Baggerley *et al.*, 2003) comparando le librerie in analisi con le librerie di controllo (ddH<sub>2</sub>O nel primo caso, e piante sane nel secondo). Dai valori ottenuti sono stati selezionati solo i miRNA che evidenziavano differenze statisticamente significative rispetto ai relativi controlli ossia miRNA con valori comparativi di FDR p-value correction < 0,05 (Benjamini & Hochberg, 1995). I valori riscontrati sono stati trasformati in funzione logaritmica (log<sub>2</sub>) per una più semplice rappresentazione ed analisi comparativa. Infine, con l'obiettivo di affinare l'analisi statistica, i miRNA differenzialmente espressi sono stati comparati anche mediante il test DFC ("distributional fold change"; Farztdinov *et al.*, 2012) selezionando solo quelli che si differenziavano per un valore assoluto maggiore di due e mediante la valutazione dell'indice

IQR ("interquartile range"; Bland, 2015) ossia lo scarto interquartile, in questo caso selezionando solo quelli che presentavano tale indice maggiore di 5. Allo scopo di rappresentare graficamente le differenze riscontrate tra le varie tesi i valori espressi mediante funzione logaritmica sono stati elaborati attraverso il sito web Clusvis (Metsalu *et al.*, 2015) per l'ottenimento della mappa di calore.

#### **1.3.4.1. Analisi dei possibili siti "target"**

Allo scopo di capire come le differenze riscontrate tra le varie tesi potessero riflettersi a livello trascrizionale e post-trascrizionale nelle piante oggetto di studio, sono stati predetti i possibili siti bersaglio dei miRNA rinvenuti maggiormente espressi. Con l'obiettivo di svolgere un'accurata analisi sono stati utilizzati tre diversi software: psRNATarget (Dai X. *et al.*, 2011), CLC Genomics Workbench (v 11.0, CLCbio, Arhus, Danimarca) e Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). I risultati della "gene ontology (GO) annotation" ottenuti mediante l'utilizzo dei tre software sopra citati sono stati elaborati graficamente mediante Blast2GO allo scopo di capire le differenze a livello metabolico dovute a diverse tipologie e relativi livelli di miRNA.

#### **1.3.5. Analisi "Northern Blot"**

L'analisi "Northern Blot" ha previsto la separazione degli "small RNA" mediante corsa elettroforetica di 5 µg di RNA totale disciolti in 20 µl di acqua deionizzata sterile e addizionati di 20 µl di colorante FLS [10 ml di formammide deionizzata, 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8.0), 10 mg xilene cianolo, 10 mg bromofenolo blu]. Dopo incubazione di 20 minuti a 65°C e raffreddamento in ghiaccio, la miscela veniva sottoposta ad elettroforesi di circa 2.30-3 h a 400 V su gel denaturante di poliacrilamide 17% [42,5 ml di soluzione 40% acrilamide/bis acrilamide (19:1), 10 ml 10 X TBE, 50 g di urea, 600 µl 10% ammonio persolfato, 40 µl TEMED, 10 ml di acqua deionizzata sterile], in tampone TBE. Terminata la corsa, il gel è stato posto in una soluzione contenente 500 ml di 1xTBE e 2 µl di etidio bromuro e la qualità degli acidi nucleici è stata controllata mediante visualizzazione al transilluminatore UV. Successivamente, il gel è stato posto in una soluzione 20xSSC (NaCl 3 M, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 0,3 M, pH 7.0) per 10 minuti e trasferito nella membrana di nylon carica positivamente (Hybond N+, Amersham International, UK) precedentemente immersa nella

soluzione 20xSSC. Gli RNA sono stati dunque trasferiti "overnight" dal gel di poliacrilamide alla membrana di nylon per capillarità mediante l'utilizzo del tampone 20xSSC secondo il protocollo descritto da Sambrook *et al* 2001. Gli RNA sono stati successivamente fissati alle membrane per esposizione ai raggi ultravioletti di 700 nm di lunghezza d'onda ("ultraviolet cross-linking"). La membrana così ottenuta può essere conservata per lungo tempo a temperatura ambiente prima di essere ibridata.

### **1.3.5.1. Preparazione sonde**

Il procedimento utilizzato per la "detection" dei miRNA differenzialmente espressi ha previsto l'utilizzo di oligonucleotidi modificati denominati LNA (Valoczi *et al.*, 2004), che permettono di ottenere sonde con una più elevata precisione e sensibilità rispetto a quelle tradizionali a DNA. Le sonde sono state preparate utilizzando 1 µl di LNA-modificato (Exiqon, Qiagen), 1 µl di 10xT4 polinucleotidi kinasi buffer, 1 µl [ $\gamma^{32}$  P] ATP [0.4 Mbq (mega-Becquerel)] (Amersham, # PB218), 1 µl di polinucleotidi kinasi T4 (Fermentas, # EK0031) e 6 µl di acqua. La miscela così ottenuta è stata incubata a 37°C per un'ora.

### **1.3.5.2. Ibridazione molecolare**

La membrana è stata posta in un apposito tubo e preibridata a 40°C per 30 minuti in un fornello rotante (Mini-Hyb, AMS, UK) in 10 ml di buffer (100 ml di soluzione: 50 ml formammide deionizzata, 25 ml 20xSSPE [NaCl 1M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, EDTA 0,04 M; pH 7,4], 10 ml di soluzione Denhardt 50x [1% Ficoll 400, 1% polivinilpirrolidone, 1% siero albumina bovina], 5 ml di SDS 10%, 9 ml di H<sub>2</sub>O e 1 ml di 2 mg ml<sup>-1</sup> di DNA di sperma di salmone. Il liquido di preibridazione è stato poi sostituito da quello di ibridazione contenente la sonda radiomarcata di LNA precedentemente denaturata a 95°C per 2 minuti e mantenuta in ghiaccio; il tutto è stato quindi lasciato nel fornello di ibridazione "overnight" a 40°C. Dopo 2 lavaggi da 10 minuti a 40°C in soluzione 2XSSC-0,1% SDS, la membrana è stata posta in cassetta autoradiografica su pellicola piana (Kodak BioMax Light Film) a -80°C. Dopo alcune ore/giorni di esposizione (a seconda dell'intensità del segnale), la pellicola veniva sviluppata per 30 sec. con Kodak GBX developer e fissata con Kodak GBX fixer.

## 2. RISULTATI

### 2.1. Analisi molecolari delle piante di *C. roseus*

L'analisi del gene ribosomico 16Sr delle piante di *C. roseus* mediante l'utilizzo dei "primers" 16RF2n/R2 ha confermato la positività delle piante infette selezionate alla presenza del fitoplasma hydrangea 35 (16SrI-B) e la negatività delle piante utilizzate come controllo.

### 2.2. Estrazione degli acidi nucleici

L'estrazione dell'RNA a carico dei tessuti fogliari e degli steli di *C. roseus* ha consentito di ottenere una concentrazione media degli acidi nucleici pari a 1.500 ng/ $\mu$ l, che presentavano rapporti di assorbanza quasi sempre pari a 2 ed ottimi livelli qualitativi (Figura 16).

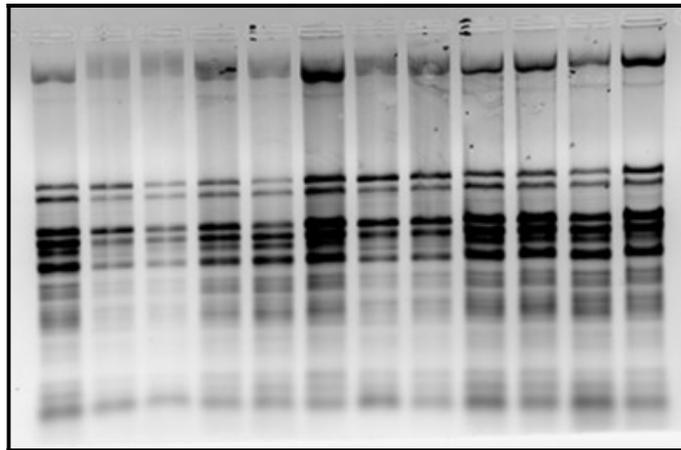


Figura 16. Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,2% TAE di RNA estratto da piante di *C. roseus*.

### 2.3. Sequenziamento mediante Illumina Hi-seq

Dal sequenziamento sono state ottenute un totale di dodici librerie, sei inerenti la prova PAW1 e nove inerenti lo studio dell'interazione pianta-fitoplasma. Tutte le librerie hanno evidenziato un'ottima riuscita del sequenziamento, con un elevato numero di letture (Tabella 13). Successivamente si è proceduto rimuovendo le letture di scarsa qualità e le sequenze inerenti gli adattatori. L'analisi della distribuzione e della lunghezza delle sequenze di small RNA ha rilevato una maggiore presenza di miRNAs di lunghezza pari a 24 nt seguita da miRNAs di lunghezza 21 nt; anche dopo l'eliminazione delle letture ridondanti le sequenze pari a 24 nt risultavano essere le più presenti. Sono stati identificati 81 diversi miRNA, più o

meno conservati, appartenenti a 36 diverse famiglie. Membri della famiglia miR166, come ad esempio miR166d e miR166f sono risultati essere quelli maggiormente presenti seguiti da miRNA appartenenti alla famiglia di miR159 e alla famiglia di miR396.

<b>Tesi</b>	<b>Libreria</b>	<b>n° di letture</b>	<b>n° di letture senza adattatori</b>
PAW1	Replica b. 1	26.901.619	26.607.758
	Replica b. 2	23.315.061	23.133.444
	Replica b. 3	13.273.280	12.719.647
ddH <sub>2</sub> O	Replica b. 1	25.353.587	25.028.886
	Replica b. 2	17.344.132	16.902.029
	Replica b. 3	13.890.882	13.660.161
PH	Replica b. 1	15.367.119	14.436.219
	Replica b. 2	20.529.869	19.139.697
	Replica b. 3	21.904.481	21.551.806
WB	Replica b. 1	27.862.117	26.981.121
	Replica b. 2	18.791.214	17.632.893
	Replica b. 3	14.857.688	14.478.414
Sane	Replica b. 1	16.025.485	15.390.889
	Replica b. 2	26.337.469	25.315.002
	Replica b. 3	18.181.990	17.492.307

**Tabella 13.** Numero di letture ottenute dal sequenziamento Illumina Hi-seq per ciascuna replica biologica.

### **2.3.1. Analisi dei miRNAs nella prova PAW**

#### **2.3.1.1. Studio dei miRNAs differenzialmente espressi**

Dopo aver analizzato tutte le sequenze mediante il software CLC Genomics Workbench (v 11.0, CLCbio, Arhus, Danimarca) ed aver svolto le opportune analisi statistiche (paragrafo 1.3.6) sono stati selezionati i miRNA differenzialmente espressi tra le tre repliche biologiche trattate con PAW1 ed i controlli trattati con acqua. Da un'analisi comparativa delle letture normalizzate, controllando che i valori di espressione fossero confermati in tutte le repliche biologiche in analisi, sono risultate essere statisticamente significative le differenze rilevate per 21 miRNAs (Tabella 14).

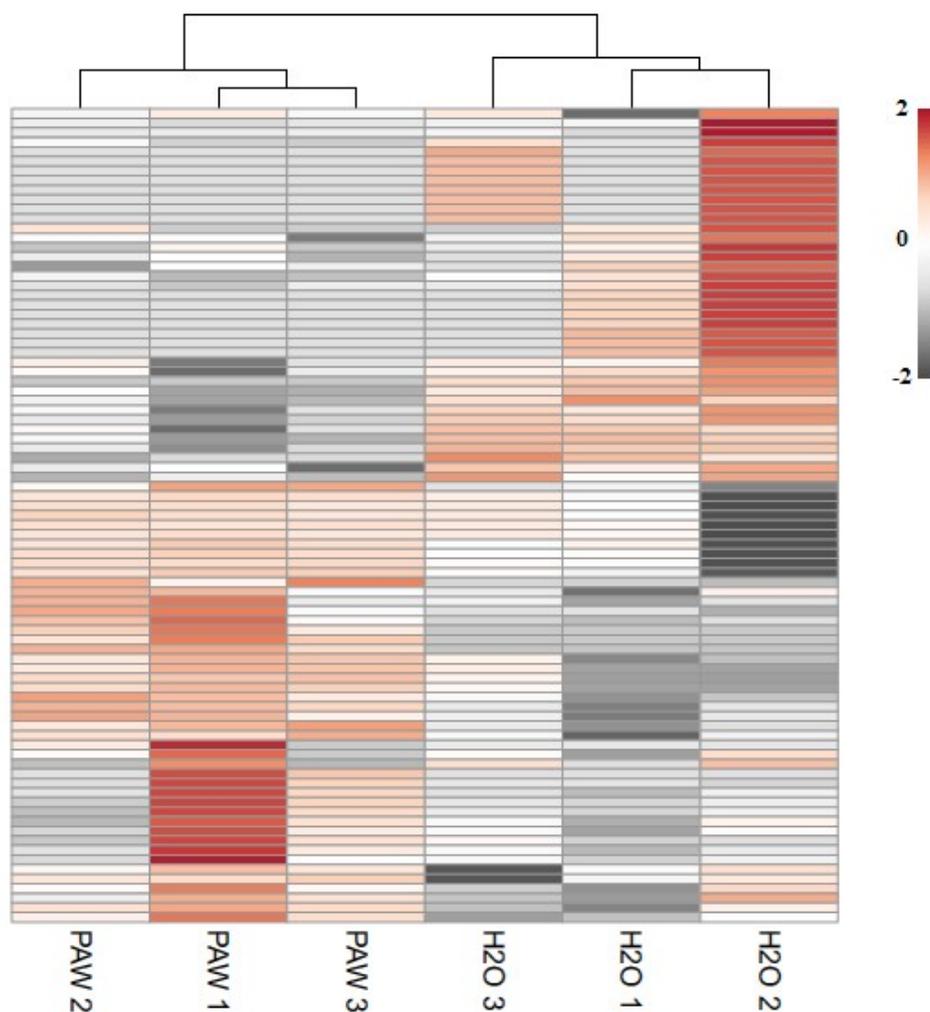
miRNA	PAW	H <sub>2</sub> O	miRNA	PAW	H <sub>2</sub> O
	n° di letture normalizzate <sup>^</sup>			n° di letture normalizzate <sup>^</sup>	
miR172a*	18,99	<b>43,88</b>	miR399b	33,6	21,05
miR172c-5p	3,47	<b>8,13</b>	miR398b	24.470,24	18.283,28
miR172c	6,69	<b>25,92</b>	miR396a*	9.791,12	3.473,35
miR157d-3p	0,76	<b>10,49</b>	miR396b	7.084,25	5.558,85
miR157a	32,45	76,13	miR396a-3p*	789,64	477,53
miR393a	128,95	<b>331,73</b>	miR165a	223,37	148,96
miR166f	1.021,06	710,88	miR8016	89,19	<b>273,77</b>
miR166d	1.188,44	<b>1.726,98</b>	miR5368	2,25	<b>14,79</b>
miR159a	34.526,29	22.389,27	novel-79	31	<b>47,96</b>
miR319a	613,36	302,02	miRnovel05	276,79	<b>327,54</b>
miR395a	15,64	0,77			

**Tabella 14.** Letture normalizzate dei livelli di miRNA rivvenuti differenzialmente espressi nelle due tesi. In grassetto i miRNA statisticamente più espressi nella tesi di controllo trattata con ddH<sub>2</sub>O. ^ = valore medio delle tre repliche biologiche analizzate.

Dai risultati ottenuti si evince come mir172a\*, miR172c-5p, miR 172c, miR157d-3p, miR157a, miR393a, miR166d, miR8016, miR5368, miRnovel-79 e miRnovel05 risultino sottoregolati nella tesi PAW1 rispetto ai controlli trattati acqua mentre risultino sovraespressi miR166f, miR159a, miR319a, miR395a, miR399b, miR398b, miR396a\*, miR396b, miR396a-3p\* e miR165a.

La mappa di calore è stata successivamente ottenuta dalla rielaborazione statistica e poi grafica delle differenze riscontrate nell'espressione dei miRNA presenti in Tabella 14, espressi attraverso valori di "fold-change" (Figura 17).

La mappa evidenzia inoltre la presenza di due "clusters" principali, uno comprendente le piante trattate con PAW1 e uno i controlli trattati con ddH<sub>2</sub>O, confermando un comportamento analogo tra le diverse repliche biologiche della stessa tesi. Sebbene i valori di espressione di alcuni miRNA siano leggermente diversi tra le repliche appartenenti alla stessa prova, è possibile notare come la mappa delinea quattro zone distinte e opposte tra le due tesi analizzate (Figura 17) confermando come alcune famiglie di miRNA risultino differenzialmente espresse a seguito del trattamento con PAW1.



**Figura 17.** Mappa di calore composta dai valori di "fold change" log<sub>2</sub> ottenuti dall'analisi statistica comparativa dei livelli di miRNA tra le repliche biologiche trattate con PAW1 e i controlli trattati ddH<sub>2</sub>O; ogni colonna esprime i valori ottenuti per la singola replica biologica. La scala della mappa di calore rappresenta i valori di "fold change" in base logaritmica attraverso un range da -2 (grigio) a + 2 (rosso); le differenze sono statisticamente significative per  $p < 0,05$ ,  $DFC > |2|$  e  $IQR > 5$ .

La porzione di mappa in basso a sinistra è caratterizzata da valori di espressione superiori nelle repliche biologiche della tesi PAW1 mentre la porzione in alto a destra evidenzia i livelli di espressione superiori nella tesi ddH<sub>2</sub>O; all'interno di queste aree le singole repliche biologiche evidenziano comportamenti leggermenti diversi sebbene appartenengano alla stessa tesi. E' possibile notare come all'interno della prova PAW la replica denominata PAW1 manifesti livelli di espressione, per alcune famiglie di miRNA, superiori alle altre due; comportamento analogo è stato rinvenuto anche nella prova di controllo per quanto

riguarda la replica H2O 2. Nonostante queste differenze, le tre repliche biologiche di ciascuna tesi manifestano un comportamento analogo e sono raggruppate in due "clusters".

### 2.3.1.2. Identificazione e classificazione dei possibili miRNA “target”

Per studiare una possibile correlazione tra i diversi livelli di espressione dei miRNA, rinvenuti nelle due tesi, e i processi biologici delle piante in esame, si è cercato di predire i loro putativi geni “target” mediante l'utilizzo di tre diversi software ossia psRNATarget (Dai *et al.*, 2011), CLC Genomics Workbench (v. 11.0, CLCbio, Arthus, Danimarca) e Blast2go (Conesa *et al.*, 2005) e i risultati sono stati comparati con la letteratura disponibile. La sequenza del trascrittoma di *C. roseus* è stata utilizzata come referenza per tutte le analisi svolte. Lo studio ha preso in esame solo i miRNA che hanno manifestato elevate omologie di sequenza con i relativi “target”, ovvero valori di "expectation" derivanti dall'algoritmo EM ("expectation-maximization") minori di 3 (Bailey & Elkan, 1995). Comparando gli "output" generati dai tre programmi utilizzati, sono stati predetti i “target” di tutti i miRNA differenzialmente espressi e per ognuno di essi sono state definite le principali funzioni biologiche ad essi correlate (Tabella 15 e 16).

miRNA	Gene	Proteina	GO (ruolo biologico)
<b>miR166 (166f)</b>	RDR6	RNA polimerasi 6 - RNA dipendente	risposte di difesa a virus silenziamento genico da RNA mantenimento dell'identità degli apici meristemati produzione di siRNA interferenti con RNA silenziamento genico indotto da virus
	ATHB-14	Box-proteine a cerniera di leucina- ATHB-14	differenziazione abassiale/adassiale dei tessuti specificazione dei meristemi apicali
	A G O 10	Proteina argonauta 10	risposte di difesa a virus silenziamento genico da RNA processo metabolico dei miRNA sviluppo organi multicellulari
<b>miR159a</b>	MYB33	Fattore di trascrizione MYB33	segnale mediato dal pathway dell'acido giberellico regolazione - della proliferazione cellulare regolazione + del pathway dell'acido abscissico regolazione + della morte cellulare programmata organizzazione stoccaggio proteico nei vacuoli

			risposta alle citochinine risposta all'etilene risposta alle giberelline
<b>miR319a</b>	TCP4	Fattore di trascrizione TCP4	differenziazione cellulare morfogenesi delle cotiledoni regolazione + dello sviluppo
	LOX 2	Lipossigenasi 2, cloroplastica	processi biosintetici nella fotosintesi fogliare processi di biosintesi dell'acido jasmonico ossidazione lipidica
<b>miR395a</b>	OsAPx7 - SIF3HL-	Stroma ascorbato perossidasi- flavonone 3 idrossilasi e proteine LRR	ATP solforilasi trasporto del solfato stroma ascorbato-perossidasi flavanone3-idrossilasi famiglia delle proteine LRR
	UBC24	Enzima E2 24 coniugato all'ubiquitina	proteine cellulari coinvolte nel catabolismo risposte cellulari implicate nell'accumulo del P omeostasi cellulare degli ioni fosforici trasporto ionico del fosfato r trasporto trans-membrana del fosfato
<b>miR399b</b>	PHR1	Proteine collegate all'immagazzinamento del fosforo	risposte cellulari alla luce e al freddo risposte cellulari implicate nell'accumulo del P ritmo circadiano omeostasi cellulare degli ioni fosforici risposte cellulari implicate nell'accumulo del P
	CSD2	Superossido dismutasi2 [Cu-Zn] , cloroplastica	risposte cellulari alla luce risposti cellulari a stress ossidativi risposti cellulari all'ozono
<b>miR398b</b>	CCS	Trasportatore del Cu per la superossido dismutasi	omeostasi cellulare degli ioni rameici trasporto degli ioni metallici
	GRF	Fattori di regolazione della crescita	risposte cellulari implicate nell'accumulo del N risposte cellulari implicate nell'accumulo del P risposte cellulari implicate nell'accumulo del K attivazione del pathway etilenico regolazione dei processi metabolici risposta al freddo
<b>miR165a</b>		Fattori di trascrizione Phabulosa-Phavoluta	fattori di tras. HD-Zip (Phabulosa-Phavoluta) regolazione dell'acido abscissico (ABA) serina/treonina fosfatasi 7

**Tabella 15.** Elenco dei principali miRNA rinvenuti maggiormente espressi nella tesi PAW1 con relativo gene “target” e principali funzioni biologiche controllate.

All'interno del gruppo di miRNA rinvenuti maggiormente espressi a seguito del trattamento con PAW1 la famiglia del miR159 è risultata associata al fattore di trascrizione MYB33, coinvolto nella regolazione positiva del "pathway" dell'acido abscissico (ABA), nel fenomeno di morte cellulare programmata e nella via metabolica dell'etilene.

I miRNA appartenenti alla famiglia di miR319 sembrano invece regolare la via biosintetica dello jasmonato evidenziando come principali "target" il fattore di trascrizione TCP4 e il gene LOX2. Il miR395 risulta invece associato ad ATP solforilasi ed ai trasportatori del solfato sottolineando la sua implicazione nei meccanismi di immagazzinamento e trasporto delle sostanze nutritive. Anche miR399 sembra svolgere un ruolo determinante a livello di regolazione nutrizionale, in quanto agendo sui geni PHR1 (codificante proteine legate all'immagazzinamento del fosforo) e PHO2 (fosfatasi 2) interviene nei fenomeni di omeostasi del fosfato. Bassi livelli di PHO2 portano ad una maggiore espressione dei trasportatori del fosfato con conseguente aumento del suo assorbimento a livello radicale. Risultato anch'esso più espresso nella tesi trattata con PAW1, il miR398 evidenzia come principali "target" le superossido-dismutasi CSD1, CSD2 e CSD3 composti chiave nel controllare i livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle cellule vegetali e nelle risposte ossidative indotte da fenomeni di stress. Fattori atti a regolare l'accrescimento (GRF) sono risultati essere invece i principali "target" della famiglia di miR396, rinvenuti anch'essi maggiormente espressi a seguito del trattamento con PAW1; agendo su questo fattore questa famiglia di miRNA sembra controllare anche fenomeni di tolleranza al freddo, l'attivazione del "pathway" dell'etilene e la risposta cellulare all'accumulo di importanti composti quali azoto, fosforo e potassio. Infine, miR165 è risultato avere come principali "target" i fattori di trascrizione PHABULOSA e PHAVOLUTA coinvolti nell'omeostasi dell'acido abscissico (ABA) e nella regolazione dello sviluppo dei tessuti fogliari; l'altro "target" ossia la serina/treonina fosfatasi 7 è invece un'enzima coinvolto nelle risposte ossidative generate dalle piante.

miRNA	Gene	Proteina	GO (ruolo biologico)
<b>miR172</b> (172a*-172c)	GI	Proteina GIGANTEA APETALA	differenziazione cellulare
			ritmo circadiano
			sviluppo dei fiori
			regolazione del fotoperiodo
TOE2	AP2-fattore di trascrizione TOE2	fattore di tras. in risposta all'etilene RAP2-7	risposta alla luce
			risposta al freddo
			risposta al perossido di idrogeno
RAP2-7	AP2-fattore di tras. TOE3	famiglia di proteine leganti il DNA (bHLH)	
TOE3	AP2-fattore di tras. TOE3	compleso associato ai microtubuli	
<b>mir157a -</b> <b>miR157d-3p</b>	SPL4	Proteina squamosa 4	sviluppo fiorale
			regolazione della fase vegetativa
			processi metabolici della pectina a livello di parete
ARP	Proteine legate all'actina	famiglia di proteine legate alla tubulina	famiglia di proteine legate all'actina
			fosfolipasi A2A
<b>miR393a</b>	TIR1	Proteina inibitrice del trasporto	proteine legate alla glutatione s-transferasi
			glutatione s-transferasi TAU16
			segnale di attivazione del pathway auxinico
			ciclo cellulare
<b>miR166</b> (166d)	RDR6	RNA polimerasi 6 - RNA dipendente	risposte di difesa
			segnale di attivazione del pathway etilenico
			sviluppo degli stami
			risposte di difesa verso i virus
AGO10	Proteina argonauta 10	proteine della famiglia fosfatasi 2	silenziamiento genico da RNA
			mantenimento dell'identità degli apici meristemati
			produzione siRNA per silenziamiento dell'RNA
<b>novel05</b>			differenziazione abassiale/adassiale dei tessuti
			silenziamiento genico da RNA
<b>novel79</b>		alfa 4 tubulina	processo metabolico dei miRNA
			sviluppo organi multicellulari
<b>novel05</b>			Risposta ad altri organismi
			RNA-leganti il dominio KH
<b>novel79</b>		alfa 4 tubulina	compleso della tubulina a livello di parete cell.
			processi a livello di microtubuli

**Tabella 16.** Elenco dei principali miRNA rinvenuti maggiormente espressi nella tesi ddH<sub>2</sub>O con relativo gene “target” e principali funzioni biologiche controllate.

Come visto precedentemente miR172a\*, miR172c-5p e miR172c sono risultati statisticamente più espressi nella tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O; questi miRNA appartengono tutti alla famiglia del miR172 il quale ha come “target” diversi fattori di trascrizione come ad esempio GIGANTEA, APETALA2, TOE2 ("AP2-like ethylene-responsive transcription factor") e RAP2 ("ethylene-responsive transcription factor RAP2") coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano, nella regolazione del fotoperiodo legato alla fioritura, nel "pathway" dell'etilene e nei fenomeni di resistenza indotta. Inoltre, suddetti miRNA regolano anche altri fattori di trascrizione del genere AP2/ERf tra cui ORCA1, ORCA 2, ORCA 3 e CR1 coinvolti nella regolazione del metabolismo secondario in *C. roseus*. Altra famiglia di miRNA rinvenuta sovra-espressa nella tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O è quella relativa a miR157; questi miRNA sono risultati dall'analisi associati al gene SPL4 ("SQUAMOSA promoter-binding-like protein 4") coinvolto nella regolazione del fotoperiodo connesso alla fioritura, alla biosintesi delle antocianine, alla deposizione di pectine a livello di parete cellulare e nella regolazione di un enzima chiave nella risposta di ipersensibilità innescata dalla pianta ossia il glutatione s-transferasi. Infine, l'analisi condotta sulla famiglia di miR393, più espressa nelle repliche biologiche trattate con ddH<sub>2</sub>O, evidenzia come principale “target” il gene TIR1 ("*Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1*") codificante un recettore auxinico; l'auxina, come noto, svolge un ruolo determinante nella crescita e fenomeni atti a limitarla, come il silenziamento ad opera di questo miRNA, possono aver luogo in risposta a svariate tipologie di stress allo scopo di ridurre i consumi d'acqua e di nutrienti.

Allo scopo di verificare se degli miRNA rinvenuti differenzialmente espressi tra le due tesi, ce ne fossero alcuni con geni “target” coinvolti nelle vie metaboliche individuate negli esperimenti di qRT-PCR, dal trascrittoma di *C. roseus* sono state selezionate le sequenze specifiche di fenilalanina ammonio liasi, strictosidina-β-glucosidasi, calcone sintasi e callosio sintasi e tutti i miRNA sono stati analizzati con il programma psRNAtarget (Dai *et al.*, 2011). Dallo studio è emersa una maggior presenza di miRNA aventi come “target” geni implicati nelle vie metaboliche di risposta a stress biotici/abiotici nei controlli, facendo presupporre ad una generale minor attività dei relativi geni “target”, fondamentali nei meccanismi di resistenza indotta. In particolare miR157d-3p, rinvenuto significativamente più espresso nella tesi di controllo, evidenzia tra i propri “target” una sequenza codificante fenilalanina ammonio liasi (TC34956) e una codificante calcone flavonone isomerasi

(TC06879). Sequenze codificanti i fattori di trascrizione AP2 (TC40624) e bHLH (TC05059), entrambi coinvolti nelle risposte ossidative messe in atto dalle piante e anche nel metabolismo degli alcaloidi, sono risultate associate a miR166d anch'esso over-espresso nei controlli (Tabella 17).

miRNA	Sequenza	Nucleotidi	Target	Mod. d'azione	Expectation	Tesi
miR157d-3p	esatta	21	TC34956	I.T.	5	ddH <sub>2</sub> O
			TC06879	T	5	ddH <sub>2</sub> O
miR166d	variante	21	TC40624	T	5	ddH <sub>2</sub> O
			TC05059	T	5	ddH <sub>2</sub> O
miR166	esatta	21	TC05059	T	4	ddH <sub>2</sub> O
miR168a	esatta	21	TC10480	T	4.5	ddH <sub>2</sub> O

**Tabella 17.** miRNA rinvenuti associati a geni implicati nel metabolismo secondario di *C. roseus*; TC34956: fenilalanina ammonio liasi2; TC06879: calcione-flavonone isomerasi; TC40624: calcione-flavonone isomerasi; TC05059: fattore di trascrizione bHLH ("basichelix-loop-helix"); TC10480: calcione-flavonone isomerasi. Le modalità di azione dei miRNA sono espresse come: I.T = inibizione della traduzione; T = taglio del trascritto.

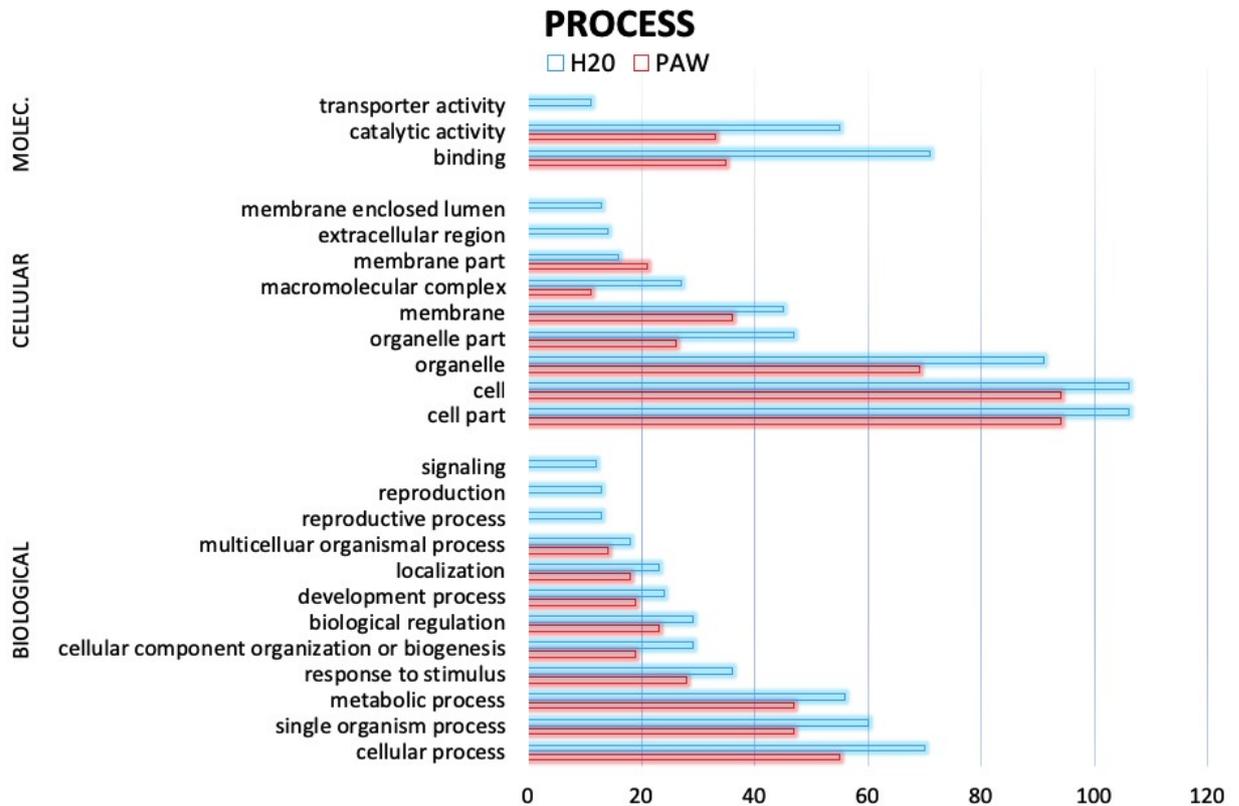
Comportamento simile è stato riscontrato anche dall'analisi delle sequenze di miR172 il quale, come nel caso di miR166d, ha tra i propri "target" i fattori di trascrizione bHLH (TC05059) implicati nella via biosintetica degli alcaloidi (Tabella 17). Infine miR168a, anch'esso più espresso nella tesi di controllo, è risultato essere associato ad un gene codificante una calcione flavonone isomerasi (TC104809; Tabella 17).

### 2.3.1.3. Analisi di ontologia genica

L'analisi di ontologia genica ("gene ontology"), eseguita mediante il programma Blast2GO, ci ha permesso di prevedere come le differenze rinvenute in termini di popolazioni/espressioni dei diversi miRNA possano influenzare a livello biologico, cellulare e molecolare il comportamento delle piante studiate.

I risultati ottenuti evidenziano come, sia a livello biologico, sia cellulare e molecolare i livelli di attività espressi nella tesi di controllo siano maggiori di quelli determinati nella tesi PAW1; questo risultato determina una maggior attività di regolazione post-trascrizionale nella tesi trattata con ddH<sub>2</sub>O che si traduce in una regolazione negativa di un maggior numero di processi (Figura 18). La tesi di controllo, in tutti e tre gli ambiti investigati, ha manifestato attività non rinvenute a seguito del trattamento con PAW1. In particolare i

miRNA hanno evidenziato maggiore attività in termini di processi riproduttivi ("signalling reproduction", "reproductive process" [funzioni biologiche]), processi cellulari come attività collegate agli organelli, alle regioni extracellulari e alle membrane e nell'ambito delle funzioni molecolari sono state determinate attività collegate ai trasportatori (Figura 18).



**Figura 18.** Analisi di ontologia genica svolta mediante il software Blast2GO dei principali miRNA rinvenuti nella tesi PAW1 e nella tesi di controllo trattata con ddH<sub>2</sub>O. Le attività sono state suddivise in base al loro ruolo: molecolare, cellulare e biologico.

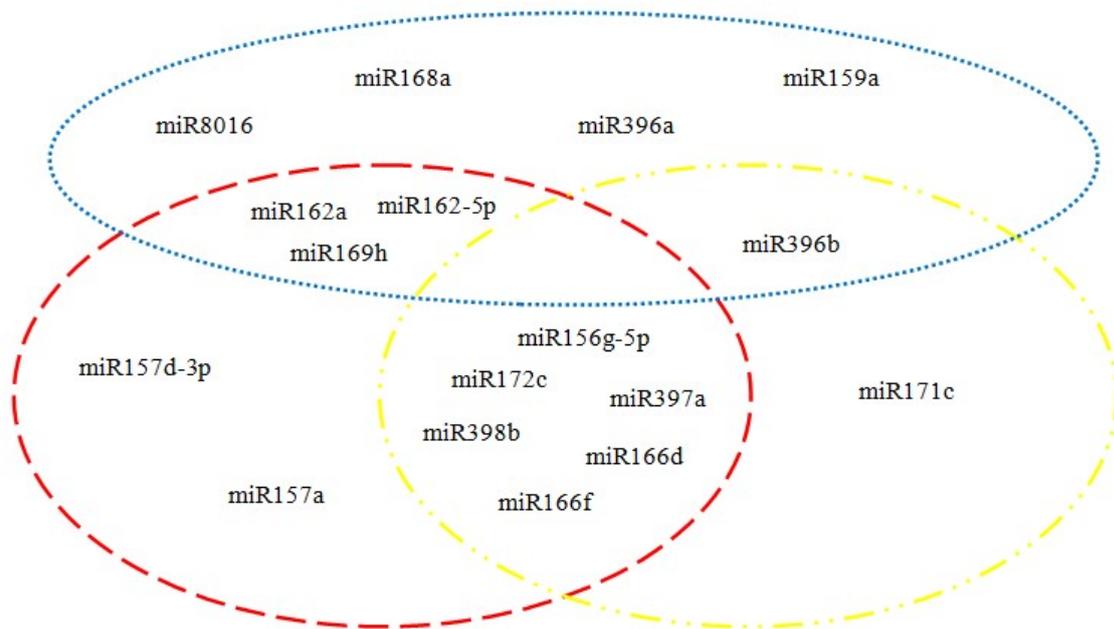
## **2.3.2. Analisi dei miRNAs nell'interazione pianta-fitoplasma**

### **2.3.2.1. Studio dei miRNAs differenzialmente espressi**

Seguendo lo stesso procedimento descritto nel paragrafo 2.3.1.2 sono stati selezionati i miRNA differenzialmente espressi tra le repliche biologiche appartenenti alla tesi delle piante infette manifestanti sintomi da fillodia (PH), tra le repliche delle piante infette con chiara sintomatologia da scopazzi (WB) e tra le piante sane (H), utilizzate come controllo. Anche in questo caso, oltre all'analisi statistica svolta attraverso il software CLC Genomics Workbench (v 11.0, CLCbio, Aarhus, Danimarca), sono state controllate tutte le letture di ogni singola replica biologica allo scopo di verificare che le differenze riscontrate fossero confermate da tutte e tre le piante di ogni tesi e non solo da singoli valori discordanti. L'analisi così svolta ha evidenziato differenze statisticamente significative per 18 miRNA (Tabella 18, Figura 19). L'elaborazione delle letture evidenzia un comportamento abbastanza simile in termini di tipologie di miRNA e loro livello di espressione tra le tesi PH e WB, in comparazione alle piante di controllo, sebbene i livelli di alcuni miRNA appaiano differenti. In particolare, in entrambe le tesi composte dalle piante infette con il fitoplasma *hydrangea* 35 (16SrI-B), sono stati rinvenuti maggiormente espressi miR156g-5p, miR166d, miR166f, miR172c, miR397a e miR398b (Tabella 18). Comportamenti discordanti tra i due gruppi di piante infette sono invece stati determinati per miR157a, miR157d-3p e miR166c-5p apparsi più espressi nella tesi WB e per miR171c-5p il quale ha manifestato un numero di letture maggiore nella tesi PH. Comparando invece le tesi in studio con il relativo controllo, ossia le piante esenti da fitoplasma, è possibile notare come alcuni miRNA quali miR159a, miR168a, miR396a\* e del miR8016 appaiano sottoregolati in presenza del patogeno (Tabella 18). Infine, il miR169h, il miR162-5p e il miR162a risultano più espressi nella tesi WB e nel controllo sano (H) rispetto alle piante manifestanti sintomi da fillodia (PH; Tabella 18).

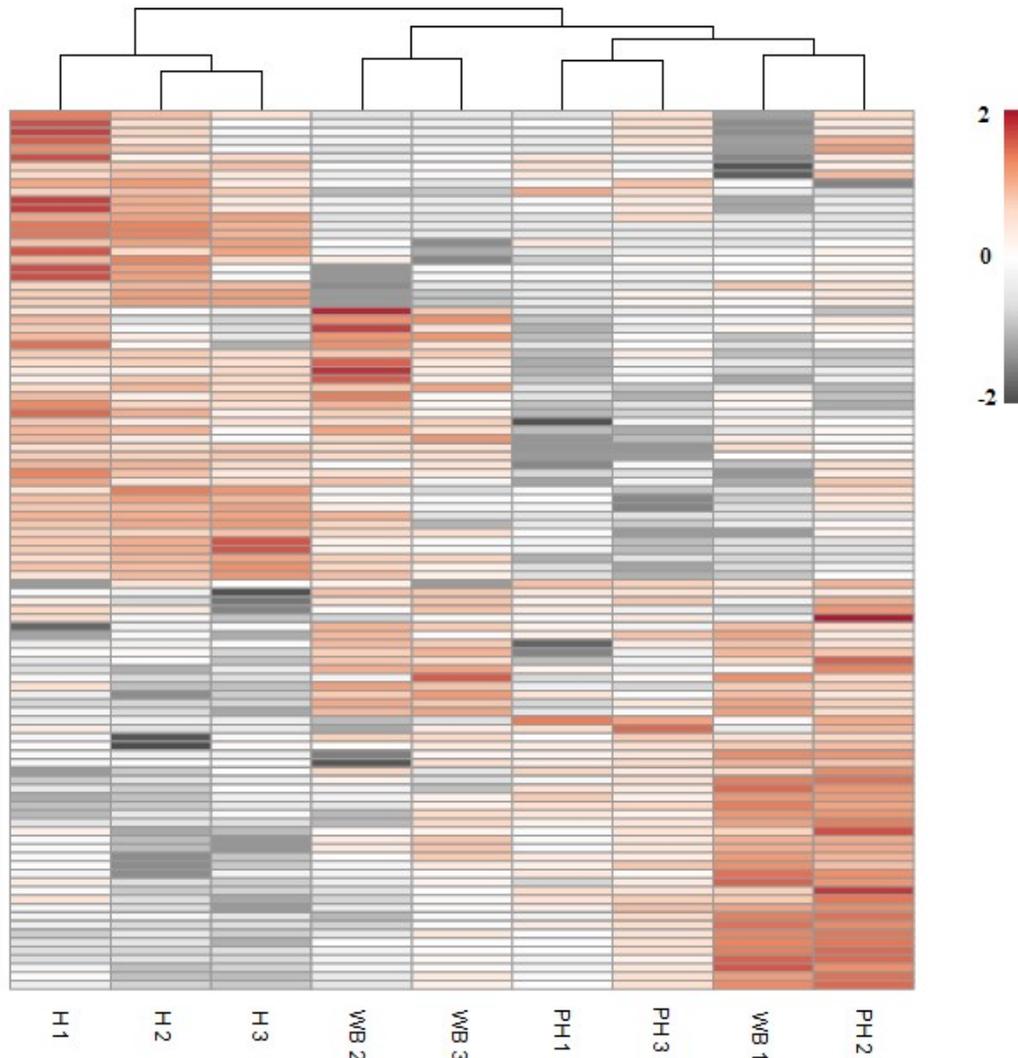
miRNA		WB	PH	H
		n° di letture normalizzate <sup>^</sup>		
<b>miR156g-5p</b>	miR156g-5p	16,41	15,71	2,26
	miR157a	3,56	2,05	0,96
<b>miR157a</b>	miR157a (2)	19,38	12,98	11,23
	miR157d-3p	400,03	73,02	144,87
<b>miR159a</b>	miR159a	1.068,36	1.038,55	1.709,86
	miR159a (2)	20.917,77	29.134,07	38.529,14
<b>miR162a</b>	miR162-5p	7,03	2,63	7,01
	miR162a1	871,33	534,26	925,78
<b>miR166c-5p</b>	miR166c-5p	70,73	15,64	40,19
	miR166c-5p (2)	20,7	3,95	4,59
<b>miR166d</b>	miR166d	15.509,76	14.103,63	8.415,40
<b>miR166f</b>	miR166f	1.030,87	975,9	771,36
	miR166f (2)	1.027,88	906,22	893,5
	miR166f (3)	2.075,34	1.487,99	1.340,83
<b>miR168a</b>	miR168a	2.912,21	900,2	4.816,11
	miR168a (2)	12,8	6,9	20,92
	miR168a (3)	0,78	0,56	4,03
	miR168a-3p*	2,6	0,73	5,25
	miR168a-3p* (2)	2,54	1,02	9,5
<b>miR169h</b>	miR169h*	4,01	0,88	7,19
<b>miR171c</b>	miR171c-5p	13,03	53,05	1,85
<b>miR172c</b>	miR172c	29,21	22,96	2,05
	miR172c (2)	27,33	24,44	1,37
	miR172c (3)	121,62	21,19	3,46
	miR172c-5p	7,04	1,71	0
	miR172c-5p (2)	7,28	2,37	2,38
<b>miR396a</b>	miR396a*	7.275,07	8.031,65	21.722,55
	miR396b	3.948,31	5.799,23	6.539,94
<b>miR397a</b>	miR397a	923,96	813,93	412,87
<b>miR398b</b>	miR398b	23.844,38	30.255,45	7.786,93
<b>miR8016</b>	miR8016	15,83	8,65	24,96
	miR8016 (2)	7,61	8,34	14,94

**Tabella 18.** Letture normalizzate dei livelli di miRNA rinvenuti differenzialmente espressi nelle tre tesi. ^ = valore medio delle tre repliche biologiche analizzate.



**Figura 19.** Rappresentazione grafica ad insiemi dei principali miRNA rinvenuti sovra-espressi nelle tesi in esame; in blu i miRNA inerenti la tesi H (piante sane), in rosso quelli appartenenti alla tesi WB (scopazzi) e in giallo quelli della tesi PH (fillodia).

Come nello studio precedente, con l'obiettivo di rappresentare graficamente le differenze emerse attraverso l'analisi statistica, i valori di "fold change" ottenuti dalla comparazione delle tre prove sono stati dapprima trasformati in scala logaritmica in base 2 e infine elaborati mediante il sito web Clusvis (Metsalu *et al.*, 2015). La rappresentazione grafica così ottenuta evidenzia la formazione di due "clusters" principali, uno comprendente le piante sane e uno le piante infette da fitoplasmosi. I risultati emersi dall'analisi delle letture normalizzate, ovvero la presenza di popolazioni e livelli di espressione dei miRNA simili tra le tesi WB e PH, vengono confermati anche dalla mappa ove si evidenziano due zone di calore (maggiori livelli di espressione) contrapposte tra le tesi infette e i controlli sani (Figura 20). Le tre repliche di controllo evidenziano profili di espressione praticamente identici tra loro caratterizzati da una zona di maggior espressione (porzione della mappa in alto a sinistra) e una zona di scarsa attività (porzione in basso a sinistra).



**Figura 20.** Mappa di calore composta dai valori di "fold change"  $\log_2$  ottenuti dall'analisi statistica comparativa dei livelli di miRNA tra le repliche biologiche infette manifestanti filodia (PH), le repliche infette con sintomi da scopazzi (WB) ed i controlli sani (H); ogni colonna esprime i valori ottenuti per la singola replica biologica. La scala della mappa di calore rappresenta i valori di "fold change" in base logaritmica attraverso un range da -2 (grigio) a +2 (rosso); le differenze sono statisticamente significative per  $p < 0,05$ ,  $DFC > |2|$  e  $IQR > 5$ .

Comportamento differente è stato invece riscontrato per le repliche delle tesi WB e PH ove i livelli di espressione sono risultati più variabili. Sebbene tutte le piante infette siano state raggruppate nel medesimo "cluster" si nota la formazione di tre sottogruppi: il primo composto da due repliche appartenenti alle tesi scopazzi (WB2, WB3), il secondo rappresentato da due repliche manifestanti filodia (PH1, PH3) mentre il terzo in cui vengono poste insieme due repliche appartenenti alle due diverse tesi ossia la pianta WB1 e

la pianta PH2. Analizzando ad uno ad uno i sottogruppi delineati è possibile notare come effettivamente i profili di espressione delle due repliche appaiano molto simili tra loro evidenziando zone di calore, tra i tre sottogruppi, leggermente diverse ( $\pm 1$  "fold change log2"). Il sottogruppo WB manifesta un maggior livello di espressione nella porzione centrale della mappa mentre il sottogruppo PH nella zona basale, risultando più simile al cluster misto composto dalle piante WB1-PH2. Proprio questo ultimo gruppo, sebbene formato da due piante appartenenti alle due diverse tesi, risulta molto omogeneo evidenziando nelle due repliche l'espressione delle medesime famiglie di miRNA e livelli di letture comparabili. Questo risultato conferma la lieve divergenza comportamentale tra le piante della tesi WB e quelle della tesi PH rinvenuta dall'analisi delle letture normalizzate ma al contempo, ponendo nello stesso gruppo la pianta WB1 e la pianta PH2, sottolinea la presenza di un profilo di espressione comune tra tutte le repliche infette.

### **2.3.2.2. Identificazione e classificazione dei possibili miRNA "target"**

Con l'obiettivo di verificare se le differenze in termini di popolazioni e livelli di espressione dei miRNA rinvenuti nelle tre tesi in esame possano influenzare il comportamento delle piante sono stati predetti i "target" di tutte le famiglie di miRNA apparse differenzialmente espresse. Come nell'esperimento precedente, per la suddetta analisi sono stati utilizzati tre diversi software ossia psRNATarget (Dai *et al.*, 2011), CLC Genomics Workbench ( v 11.0, CLCbio, Arthus, Danimarca) e Blast2go (Conesa *et al.*, 2005) e i risultati sono stati comparati con la letteratura disponibile. La sequenza del trascrittoma di *C. roseus* è stata utilizzata come referenza per tutte le analisi comparative. Anche in questo caso sono stati presi in considerazione solamente i miRNA che hanno manifestato elevate omologie di sequenza con i relativi "target", ovvero valori di "expectation" derivanti dall'algoritmo EM ("expectation-maximization") minori di 3 (Bailey & Elkan, 1995). Successivamente, comparando gli "output" generati dai tre programmi utilizzati, sono stati predetti i "target" di tutti i miRNA differenzialmente espressi e per ognuno di essi sono state definite le principali funzioni su cui essi andrebbero ad agire (Tabella 19).

<b>miRNA</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>GO (ruolo biologico)</b>
<b>miR156 (156g-5p)</b>	SPL3	Proteina squamosa 3	differenziazione cellulare e sviluppo florale regolazione della fase vegetativa transizione fase vegetativa/riproduttiva
	HSTY1	Proteina HASTY 1	silenziamento genico da RNA regolazione negativa dello sviluppo florale regolazione del flusso proteico sviluppo degli steli / morfologia fogliare
	CYP78A5	Citocromo P450 78A5	sviluppo organi floreali regolazione + della proliferazione cellulare regolazione + della crescita degli organi via biosintetica del metabolismo secondario
<b>miR166 (166d/f)</b>	RDR6	RNA polimerasi 6 RNA dipendente	risposta di difesa verso virus silenziamento genico da RNA mantenimento dell'identità meristemica produzione siRNA coinvolti nel silenziamento silenziamento indotto da virus
	ATHB-14	Box-Proteine a cerniera di leucina- ATHB-14	differenziazione abassiale/adassiale dei tessuti specializzazione dei meristemi apicali
	A G O 10	Proteina argonauta 10	risposte di difesa verso virus silenziamento genico da RNA processo metabolico dei miRNA sviluppo organi multicellulari
<b>miR172 (172c)</b>	GI	Proteina GIGANTEA	differenziazione cellulare ritmo circadiano e sviluppo florale regolazione fotoperiodo risposta alla luce ed al freddo
	TOE2	AP2-fattore di tras. TOE2	risposta al perossido di idrogeno attivazione pathway etilenico sviluppo organi multicellulari
	RAP2-7	fattore di tras. in risposta all'etilene RAP2-7	resistenza alle malattie
	TOE3	AP2-fattore di tras. TOE3	complesso associato ai microtubuli
<b>miR397a</b>	SPL7	Proteina squamosa 7	risposta cellulare all'accumulo di ioni Cu <sup>2+</sup> regolazione dello sviluppo Laccasi 3
<b>miR398 (398b)</b>	CSD2	Superossido dismutasi2 [Cu- Zn] , cloroplastica	risposta cellulare a stress ossidativo e alla luce risposta cellulare a ozono trasporto ioni metallo

**Tabella 19.** Elenco dei principali miRNA rinvenuti maggiormente espressi in entrambe le tesi infette (WB, PH) in comparazione con le piante sane di controllo (H).

Come si può notare dalla tabella 19, entrambe le tesi infette con il fitoplasma *hydrangea* 35 (16SrI-B) hanno evidenziato livelli di espressione più elevati per miR156g-5p, miR166d, miR166f, miR172c, miR397a e miR398b. La famiglia di miR156 è risultata associata al gene SPL3 codificante la proteina squamosa 3, al gene HASTY1 codificante la proteina omonima trasportatrice di miRNA, e al citocromo P450; questi geni regolano diversi processi fisiologici tra cui lo sviluppo dei fiori, delle foglie, degli steli, la differenziazione cellulare, il passaggio dalla fase vegetativa a quella riproduttiva e altre funzioni implicate nello sviluppo e nella crescita della pianta. Una maggior presenza di questo miRNA nelle piante infette testimonia una regolazione negativa di suddetti processi fisiologici. Anche la famiglia miR166, sovraespressa in presenza del patogeno, sembra influenzare l'accrescimento e la differenziazione dei tessuti vegetali avendo tra i propri "target" il box delle proteine a cerniera di leucina denominato REVOLUTA (HD-SIP); suddetto comparto agendo come fattore di trascrizione influisce sul normale accrescimento modificandone sia l'orientamento sia il controllo meristemico. Altri "target" individuati dall'analisi sono risultati essere la polimerasi-RNA dipendente 6 implicata in fenomeni di resistenza indotta da virus, nel silenziamento genico e nella produzione di siRNA e la proteina argonauta 10 composto fondamentale nella via biosintetica dei miRNA e nei meccanismi di risposta messi in atto dalle piante.

Comportamento analogo è stato determinato per la famiglia miR172 la quale, avendo tra i propri "target" il gene GI codificante la proteina GIGANTEA e diversi fattori di trascrizione AP2/ERF implicati nel "pathway" etilenico risulta coinvolta nella regolazione di importanti processi fisiologici tra cui il ritmo circadiano, il fotoperiodo, la differenziazione cellulare, lo sviluppo florale e le risposte agli stimoli esterni come la luce e il freddo. Altra famiglia maggiormente espressa nelle tesi WB e PH è risultata essere quella di miR397 avente come principale "target" il gene SPL7 codificante la proteina squamosa 7 implicata nella regolazione della crescita e nei fenomeni di assorbimento e immagazzinamento degli ioni  $\text{Cu}^{2+}$ . Il miR397 è risultato inoltre associato al gene codificante l'enzima laccasi composto coinvolto nei fenomeni di ossidazione a carico dei fenoli e di degradazione della lignina. Infine, la famiglia di miR398 avente come "target" le tre superossido dismutasi CSD1, CSD2 e CSD3 è risultata coinvolta nei fenomeni di risposta agli stress ossidativi quali l'esposizione alla luce, ai metalli pesanti, all'ozono oppure a stimoli di origine biotica.

<b>miRNA</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>GO (ruolo biologico)</b>
<b><u>miR162-5p - miR162a</u></b>	DCL1	Dicer-like1	miRNA biosintesi
<b><u>miR169h</u></b>	CRN	proteina chinasi CORYNE	regolazione sviluppo florale fosforilazione proteica regolazione crescita meristemica
	CLV2	Proteina CLAVATA2	sviluppo meristemi sviluppo organi multicellulari
<b><u>mir157a - miR157d-3p</u></b>	SPL4	Proteina squamosa 4	sviluppo florale regolazione della fase vegetativa

**Tabella 20.** Elenco dei miRNA maggiormente espressi nella tesi scopazzi (WB) in comparazione con la tesi fillodia (PH). I miRNA sottolineati sono risultati espressi sia nella tesi WB sia nei controlli sani (H) testimoniando una sottoregolazione nella tesi PH.

Livelli di espressione differenti tra le tesi WB e PH sono invece stati determinati per miR157a, miR157d-3p, miR171c-5p, miR169h, miR162a, miR162-5p e miR396b (Tabelle 20, 21). In particolare la famiglia di miR157, rinvenuta maggiormente presente nelle repliche biologiche della tesi WB, evidenzia come principale “target” il gene SPL4 codificante la proteina squamosa 4 e implicata in fenomeni atti a regolare lo sviluppo florale, la fase vegetativa e la morfologia dei tessuti fogliari. Contrariamente la famiglia miR171 è apparsa più espressa nella tesi manifestante sintomi da fillodia e mostra come principale “target” i geni della famiglia GRAS, numerosa famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione di svariati processi durante lo sviluppo delle piante. Sotto-regolati rispetto alla tesi WB e ai controlli negativi (H) sono invece risultati nella tesi PH il miR169h, il miR162-5p e il miR162a. La famiglia del miR169 è risultata associata alla proteina-chinasi CORYNE e alla proteina CLAVATA2 entrambe coinvolte nella regolazione di processi fisiologici quali lo sviluppo meristemico, lo sviluppo florale e di organi multicellulari. miR162 sembra invece implicato nella regolazione del DICER-LIKE 1 catalizzante la formazione dei miRNA e quindi composto fondamentale nei processi di regolazione a livello post-trascrizionale.

Meno presente nella tesi WB rispetto alla tesi PH e alle tre repliche di controllo è invece apparso miR396b avente come principali “target” i fattori di regolazione della crescita GRF3 e GRF2; questi fattori sembrano coinvolti nei meccanismi di assorbimento e conservazione dei nutrienti, nel "pathway" dell'etilene e nella proliferazione cellulare.

<b>miRNA</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>GO (ruolo biologico)</b>
<b>miR396b</b>	GRF3	Fattore di regolazione della crescita 3	risposte cellulari implicate nell'accumulo del N risposte cellulari implicate nell'accumulo del P risposta cellulare agli ioni potassio attivazione del pathway etilenico regolazione dei processi metabolici risposta al freddo risposta al congelamento
	GRF2	Fattore di regolazione della crescita 2	regolazione - della proliferazione cellulare
<b>miR171c-5p</b>	GRAS	Fattore di trascrizione GRAS	trasporto del sodio proteine fosfatasi endo-esonucleasi proteine di risposta all'auxina-SAUR

**Tabella 21.** Elenco dei miRNA rinvenuti maggiormente espressi nella tesi manifestante fillodia (PH) in comparazione con la tesi scopazzi (WB). Il miR396b è risultato maggiormente espresso sia nella tesi PH sia nei controlli sani (H) testimoniando una sottoregolazione nella tesi WB.

Analizzando e comparando i risultati ottenuti è inoltre possibile determinare come alcune famiglie di miRNA siano risultate sotto-esprese nelle tesi inerenti le piante infette rispetto ai controlli sani. Nello specifico sono apparsi meno presenti miR159a, miR168a, miR396a e miR8016 (tabella 22). La famiglia miR159 è risultata avere come principale “target” il fattore di trascrizione MYB 33, coinvolto prevalentemente in fenomeni di risposta verso agenti patogeni e nella regolazione di importanti ormoni quali citochinine, giberelline e acido abscissico. Il miR168 sembra invece regolare maggiormente processi messi in atto dalla pianta in risposta a stimoli esterni di origine biotica ed abiotica controllando la proteina argonauta 1 e quindi influenzando la regolazione post-trascrizionale. Sembra influenzare infatti le risposte indotte dalla pianta in presenza di virus, la risposta immunitaria innata, il silenziamento genico e il metabolismo dell’auxina. La famiglia miR396a, come visto precedentemente, evidenzia come principale “target” i fattori di regolazione della crescita (GRF) influenzando il metabolismo dei nutrienti e il "pathway" etilenico. Infine, l’ultimo miRNA apparso più espresso nei controlli sani è miR8016 risultato associato alla famiglia proteica MATE coinvolta nei meccanismi di trasporto transmembrana.

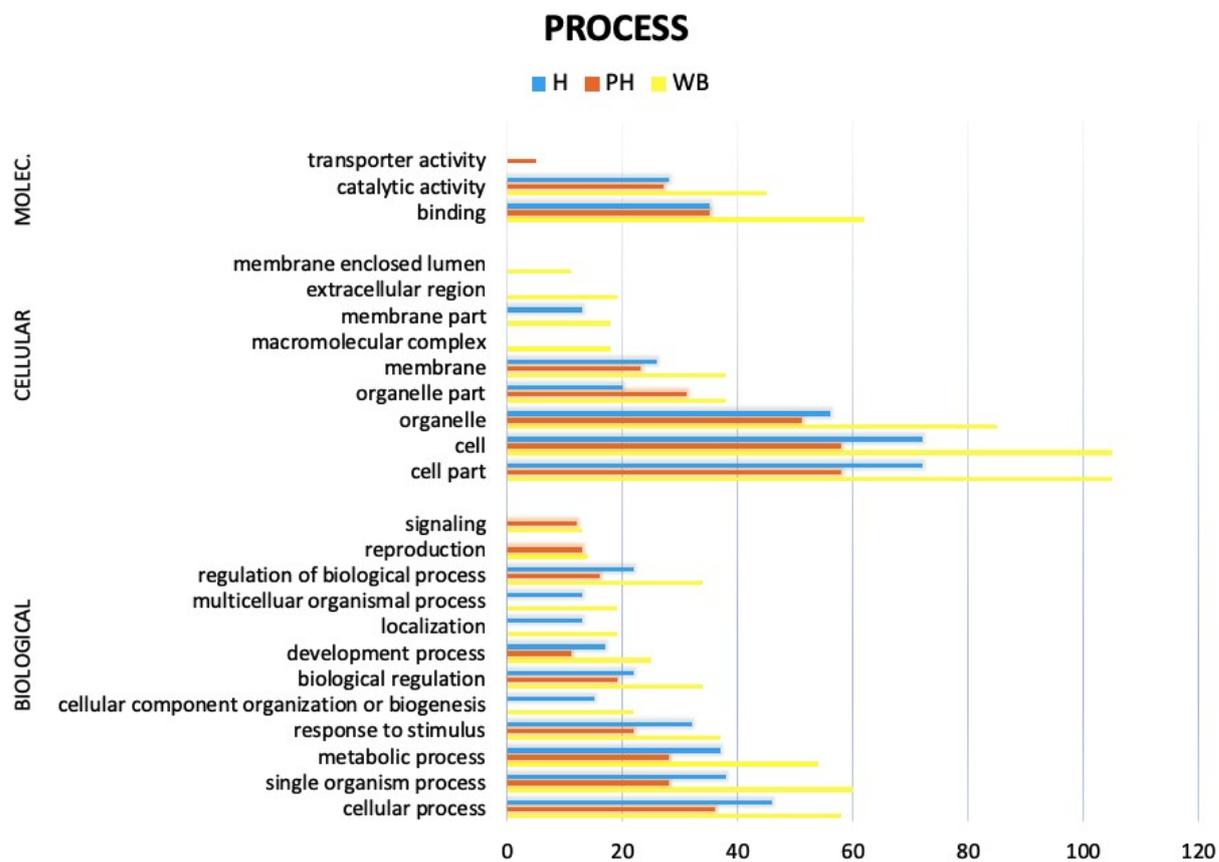
<b>miRNA</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>GO (ruolo biologico)</b>
<b>miR159a</b>	MYB33	Fattore di trascrizione MYB33	segnale mediato dal pathway dell'acido giberellico regolazione - della proliferazione cellulare regolazione + del pathway dell'acido abscissico regolazione + della morte cellulare programmata organizzazione stoccaggio proteico nei vacuoli risposta alle citochinine risposta all'etilene risposta alle giberelline
<b>miR162-5p - miR162a</b>	DCL1	Dicer-like1	miRNA biogenesi
<b>miR168a</b>	A G O1	Proteina argonauta 1	differenziazione abassiale/adassiale dei tessuti metabolismo auxina risposte di difesa verso virus silenziamneto genico da RNA risposta immunitaria innata morfogenesi fogliare formazione tessuti vascolari silenziamento post-trascrizionale risposta alla luce processi virali
<b>miR169h</b>	CRN	Proteinachinasi CORYNE	regolazione sviluppo florale fosforilazione proteica regolazione crescita meristemica
	CLV2	Proteina CLAVATA2	sviluppo meristemi sviluppo organi multicellulari
<b>miR396a/b</b>	GRF	Fattori di regolazione della crescita	risposte cellulari implicate nell'accumulo del N risposte cellulari implicate nell'accumulo del P risposte cellulari implicate nell'accumulo del K attivazione del pathway etilenico regolazione dei processi metabolici risposta al freddo risposta al congelamento
<b>miR8016</b>	MATE	Proteina trasportatrice di tossine	trasporto di membrana Proteina fosfatasi 2 proteine della famiglia GH3

**Tabella 22.** Elenco dei miRNA rinvenuti sotto-regolati nelle tesi WB e PH in comparazione alla tesi di controllo (H).

### **2.3.2.3. Analisi di ontologia genica**

Per approfondire le possibili cause delle difformità riscontrate in termini di popolazioni e livelli di espressione delle singole famiglie di miRNA si è proceduto mediante l'analisi di ontologia genica. Utilizzando il software Blast2GO, come nell'esperimento precedente, è stato possibile raggruppare in tre ambiti di studio ossia processi biologici, processi cellulari e processi molecolari le principali differenze riscontrate in termini di GO "annotations".

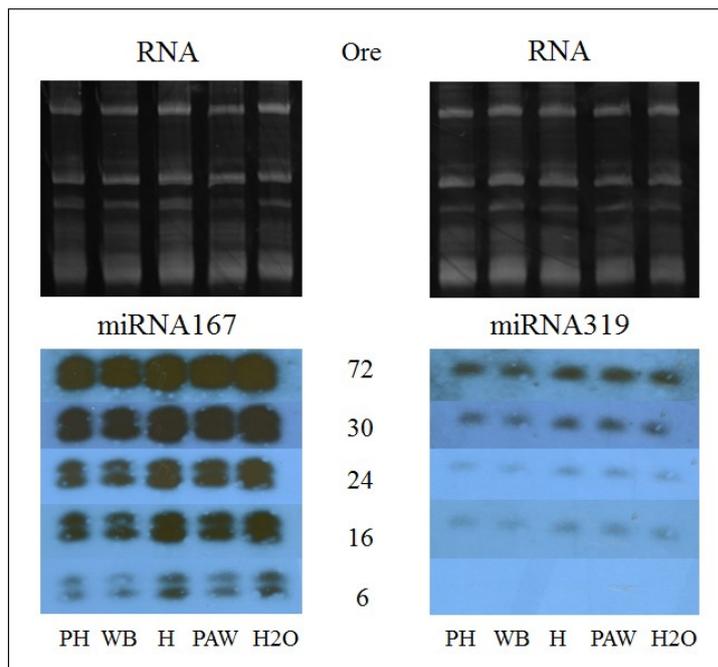
L'analisi ha fatto emergere una maggior attività post-trascrizionale nelle repliche biologiche della tesi scopazzi (WB) rispetto a quelle infette manifestanti fillodia (PH) e quelle della tesi di controllo (H); questo risultato è in accordo con l'analisi delle letture svolte precedentemente ove erano state registrate popolazioni di miRNA più numerose proprio in suddetta tesi. In particolare la tesi WB ha espresso, a livello biologico, maggiore attività nelle segnalazioni connesse al sistema riproduttivo, nei processi riproduttivi stessi e nelle reazioni che regolano l'organismo a livello multicellulare (Figura 21). Le differenze più evidenti sono emerse però nei processi di origine cellulare ove, a differenza delle tesi PH e H, la tesi WB ha evidenziato attività a livello di regioni extracellulari, di complessi di macromolecole e a livello di membrana citoplasmatica (Figura 21). D'altra parte le repliche delle tesi PH e H sono risultate associate ad un numero maggiore di "target" coinvolti in processi di legame cellulare e di simplasto. Infine, per quanto riguarda le funzioni molecolari la tesi WB ha messo in luce, rispetto agli altri due casi studio, maggior attività in termini di reazioni catalitiche e di legame ma nessuna interazione a livello di attività di trasporto (Figura 20). Nello specifico sia la tesi WB che la tesi PH hanno manifestato maggior attività a livello di idrolisi, di reazioni di ossidoriduzione e di legami a RNA. Solo la tesi PH è risultata coinvolta in meccanismi atti a regolare i legami GTP ed il trasporto attivo a livello di membrana.



**Figura 21.** Analisi di ontologia genica svolta mediante il software Blast2GO dei principali miRNA rinvenuti nella tesi WB, nella tesi PH e nella tesi di controllo H. Le attività sono state suddivise in base al loro ruolo: molecolare, cellulare e biologico.

## 2.4. Analisi mediante "Northern-blot"

Allo scopo di validare i risultati ottenuti mediante sequenziamento Illumina i principali miRNA differenzialmente espressi nelle tesi in esame sono stati analizzati mediante ibridazione con specifiche sonde a LNA. Sono stati accertati i livelli di espressione di miR156, miR159, miR166, miR167, miR168, mir172, miR319, miR393 e miR398. La durata di esposizione delle membrane in cassetta autoradiografica è risultata molto variabile a seconda del miRNA analizzato: miR167, miR166, mir172 risultavano visibili già dopo 6 ore mentre, per poter ottenere il medesimo risultato con miR156, miR398 e miR159 sono risultate necessarie fino a due settimane. I risultati ottenuti hanno confermato le letture generate dal sequenziamento Illumina Hi-seq per tutti i miRNA in analisi ad eccezione di miR319 e miR393 ove non è stato possibile evidenziare differenze in termini di ibridazione (Figura 22).



**Figura 22.** RNA in gel di poliacrilammide 12% e relativi livelli di espressione dei miRNA in esso presenti a diversi tempi di esposizione: dal basso 6, 16, 24, 30, 72 ore in cassetta radiografica. A sinistra ibridazione su miR167 e a destra ibridazione su miR319.

### **3. DISCUSSIONE**

Allo scopo di approfondire, da un lato l'effetto in pianta del trattamento con PAW1 e dall'altro le modalità di risposta delle piante all'infezione da fitoplasma, è stato condotto uno studio sulle popolazioni e relativi livelli di espressione delle principali famiglie di miRNAs. Le sequenze ottenute mediante metodo Illumina Hi-seq sono risultate tutte di ottima qualità essendo composte da un elevato numero di letture; l'analisi ha evidenziato la maggior presenza, in *C. roseus*, di miRNAs di lunghezza pari a 24 nt seguita da miRNAs di 21 nt. Degli 81 miRNA rinvenuti, appartenenti a 36 diverse famiglie, sono risultati maggiormente presenti quelli appartenenti alle famiglie miR166, miR159 e miR396.

#### **3.1. Effetto del trattamento PAW**

Il sequenziamento su tessuti fogliari e fusti campionati a 16 ore dal trattamento ha evidenziato differenze statisticamente significative nelle popolazioni di miRNA delle repliche biologiche appartenenti alle due tesi in esame (PAW1, ddH<sub>2</sub>O). In particolare, sono stati rinvenuti maggiormente espressi nella tesi trattata ddH<sub>2</sub>O miRNA appartenenti alle famiglie miR172, miR157, miR393, miR8016 e miR5368 mentre nella tesi PAW1 quelli inerenti le famiglie miR159, miR319, miR395, miR399, miR398, miR396 e miR165.

La famiglia miR172, più presente nel controllo trattato acqua, ha come "target" diversi fattori di trascrizione come GIGANTEA, APETALA2, TOE2 e RAP2 coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano, del fotoperiodo connesso alla fioritura, del "pathway" etilenico e dei meccanismi di resistenza indotta (Prakash *et al.*, 2015). Studi condotti da Schwab *et al.*, 2005 e da Chuck *et al.*, 2007 hanno dimostrato come le fasi di transizione nello sviluppo di alcune piante siano regolate dall'attività antagonista tra questo miRNA e miR156, concentrazioni crescenti di miR156, in concomitanza a ridotta attività di miR172, sembrano limitare le transizioni da una fase evolutiva all'altra, prolungando la fase giovanile e ritardando la fioritura (Chuck *et al.*, 2007). Contrariamente, alti livelli di miR172 inibendo l'attività di APETALA2 e di alcuni repressori della fioritura (SMZ, SNZ, TOE1 e TOE2) velocizzano il raggiungimento della fase adulta nelle foglie e inducono precocemente la fioritura (Aukerman & Sakai, 2003). Suddetto miRNA evidenzia tra i propri "target" anche fattori di trascrizione AP2/ERf tra cui ORCA1, ORCA2, ORCA 3 e CR1 coinvolti nella via biosintetica degli alcaloidi (Liu *et al.*, 2017); una maggior espressione di questo miRNA

potrebbe dunque alterare l'attività di questi importanti fattori di trascrizione limitando conseguentemente la sintesi di suddetti composti. Piante di *C. roseus* silenziate per il gene codificante il fattore CR1 hanno manifestato una sovra-espressione dell'intero "pathway" metabolico ed in particolare dei geni G10H (geraniolo-10-idrossilasi), SLS (secolaganina sintasi), TDC (triptofano decarbossilasi), STR (strictosidina sintasi), SGD (strictosidina- $\beta$ -glucosidasi), DAT (deacetilvindolina-4-O-acetiltransferasi) e PRX (perossidasi) producendo un quantitativo maggiore dell'alcaloide vindolina (Liu *et al.*, 2017).

Altra famiglia di miRNA, rinvenuta maggiormente espressa nei controlli trattati con acqua distillata e quindi sottoregolata nella tesi PAW1, è risultata quella di miR157 avente come principale "target" il gene SPL4 ("squamosa promoter-binding-like protein 4") coinvolto nella regolazione del fotoperiodo connesso alla fioritura, nella biosintesi delle antocianine e nel metabolismo della pectina a livello di parete cellulare (Prakash *et al.*, 2015). Suddetto miRNA è risultato inoltre associato a geni codificanti la famiglia proteica delle glutatione-s-transferasi, enzimi fondamentali nelle risposte ossidative messe in atto dalle piante (Hung *et al.*, 2005). Variazioni delle concentrazioni di questo enzima sono considerate essere uno dei primi segnali di risposta ossidativa; livelli superiori dei propri trascritti sono infatti stati determinati in piante sottoposte a codesto stress (Hung *et al.*, 2005).

Ulteriore miRNA risultato sottoregolato a seguito del trattamento con PAW1 è miR393 che presenta come principale "target" il gene TIR1 ("protein transporter inhibitor response 1") codificante un recettore auxinico coinvolto nella regolazione dei segnali mediati da auxina e implicato nei fenomeni di accrescimento dell'ipocotile, delle radici secondarie e in generale della distensione cellulare. Concentrazioni elevate di miR393, o di altri miRNA aventi come "target" il "pathway" di segnalazione dell'auxina, sembrano manifestarsi in risposta a diversi fenomeni di stress allo scopo di ritardare lo sviluppo della pianta e ridurre il consumo di acqua e nutrienti (Sunkar *et al.*, 2012; Ehya *et al.*, 2013). Sottoregolato nella tesi PAW1 è risultato anche miR8016 avente tra i propri "target" il gene MATE codificante trasportatori trans-membrana implicati in fenomeni indotti da stress o nell'idrolisi di ATP (Vijverberg *et al.*, 2016).

Più espressa a seguito del trattamento con PAW1 è risultata la famiglia di miR159 che ha come principale "target" il fattore di trascrizione MYB33 coinvolto nella regolazione positiva dell'acido abscissico, nella morte cellulare programmata e nel "pathway"

dell'etilene (Prakash *et al.*, 2015). Membri della famiglia di questo fattore di trascrizione esercitano un ruolo fondamentale nelle risposte di difesa indotte dalla pianta e nella regolazione ormonale (Liu *et al.*, 2008). Livelli maggiori di miR319, avente come principali "target" i geni TCP4 e LOX2 coinvolti nella biosintesi dell'acido jasmonico (Snyman *et al.*, 2017; Schommer *et al.*, 2008), limitano l'espressione di codesta via metabolica confermando i risultati ottenuti da Perez 2016 ove, a seguito di trattamento con PAW1 su piante di pomodoro, non era stata riscontrata alcuna sovra-espressione dei geni coinvolti in tale "pathway". Altra famiglia di miRNA maggiormente espressa a seguito di esposizione con PAW1 è risultata quella di miR395, concentrazioni elevate di codesta sequenza si verificano solitamente in risposta a carenze di solfato e presentano come principali "target" ATP solforilasi ed appunto, i trasportatori del solfato (Matthewman *et al.*, 2012). Il miR395 è inoltre associato ai fenomeni di stress ossidativo evidenziando aumenti dei propri livelli di espressione durante tale meccanismo di risposta (Dong-Wen *et al.*, 2016).

Comportamento simile è espresso anche da miR399 il quale, avendo come principale "target" il gene PHO2 ("ubiquitin-conjugating E2") coinvolto nell'omeostasi del fosfato, gioca un ruolo fondamentale nelle risposte messe in atto dalla pianta in situazioni di carenza di tale elemento. Livelli inferiori del gene PHO2 generano una maggior espressione dei trasportatori del fosfato che conseguentemente portano ad un maggior accumulo di codesto elemento. E' stato dimostrato inoltre come piante esposte a deficienze da fosfato risultino maggiormente colonizzate dalle specie fungine (Matthewman *et al.*, 2012). L'azione di miR398, anch'esso più espresso nella tesi PAW1, è coinvolta nelle risposte delle piante a seguito di stress ossidativo avendo come "target" principali le superossido dismutasi CSD1, CSD2 e CSD3. Svitati studi correlano le variazioni dei suoi livelli di espressione con il manifestarsi di differenti fenomeni di stress nelle piante ma i risultati non sono sempre concordanti evidenziando a volte una sua sovra-espressione e a volte una sua sotto-regolazione (Ferdous *et al.*, 2015). Infine, sono stati rinvenuti maggiormente espressi miR396 associato a GRF ("growth-regulating factor") coinvolto principalmente nel metabolismo dei nutrienti e dell'etilene e miR165 avente come principali "target" i fattori di trascrizione PHABULOSA e PHAVOLUTA coinvolti prevalentemente nella crescita abassiale e adassiale delle foglie durante il loro sviluppo (Emery *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2016). L'analisi dei geni "target" ha rivelato inoltre come miR165 agisca a livello delle

proteine serina/treonina fosfatasi implicando un suo ruolo diretto nei fenomeni di stress ossidativo. L'inattivazione di queste proteine è stato dimostrato essere uno step cruciale nella via di trasduzione del segnale mediato da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hung *et al.*, 2005).

L'analisi svolta ha evidenziato le differenze riscontrate in termini di popolazioni di miRNA tra le due tesi in esame ed ha cercato, mediante la predizione dei possibili geni "target", di fornire un quadro generale sulle possibili modificazioni a livello biologico, cellulare e molecolare indotte dal trattamento con PAW1. Definire con precisione quali processi metabolici vengano influenzati non risulta possibile in quanto l'azione dei miRNA appare molto complessa e nella maggior parte dei casi co-regolata da diverse famiglie in modo differente a seconda della specie vegetale, dell'età della pianta e di molteplici fattori. Partendo dai risultati sopra citati è stato comunque possibile delineare due comportamenti distinti tra le tesi in esame confermando in ogni caso un effetto dell'acqua attivata al plasma sulla regolazione post-trascrizionale delle piante. In particolare alcune famiglie di miRNA rinvenute maggiormente espresse in *C. roseus* a seguito del trattamento con PAW1 quali miR398, miR395 e miR159 sono stati descritti come sovra-espresi a seguito di esposizioni a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dong-Wen *et al.*, 2016). Questa correlazione supporta l'idea che il trattamento con PAW1 stimoli diversi "target" coinvolti nelle risposte a stress ossidativo in pianta. Ipotesi rafforzata anche dal comportamento di miR165 e miR166f, più presenti nella tesi PAW1, e aventi come "target" due proteine serina/treonina fosfatasi 2C, specificatamente ABI1 e ABI2; questi due enzimi risultano inattivati rapidamente dalla presenza di elevate concentrazioni di GSH (glutazione) correlate all'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hung *et al.*, 2005). ABI1 e ABI2 vengono quindi descritti come i principali recettori del segnale generato dalla presenza di perossido di idrogeno in pianta (Hung *et al.*, 2005). Medesimo comportamento viene confermato anche dai livelli di espressione inerenti miR157 risultato sotto-regolato a seguito del trattamento con PAW1; suddetto miRNA regola negativamente GST (glutathione-s-transferasi) enzima chiave nei meccanismi di risposta ossidativi regolando la riduzione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O (Hung *et al.*, 2005). La presenza, a seguito dell'esposizione a PAW1, di livelli di espressione maggiori di miR165 e miR166f (inattivanti AB1 e ABI2) in concomitanza con la sotto-regolazione di miR157 (maggior presenza di glutathione-s-transferasi) conferma la presenza di una risposta a stress ossidativo. In aggiunta, miR157 è risultato avere come "target" geni coinvolti nella formazione di microtubuli di actina e

pectina a livello di parete cellulare, fenomeni coinvolti nelle prime forme di risposta a stress. Ulteriore considerazione, a supporto di tale teoria, è la sotto-regolazione del fattore di trascrizione APETALA2 nelle piante di controllo, risultato essere uno degli intermediari della risposta generata dalla pianta in risposta all' $H_2O_2$  (Hung *et al.*, 2005). Interessante anche il comportamento riscontrato per miR398 sovra-espresso a seguito del trattamento con PAW1; questo "small RNA" ha come "target" le superossido dismutasi CSD1, CSD2 e CSD3 enzimi coinvolti nella detossificazione delle forme reattive dell'ossigeno. La sua implicazione in reazioni di risposta a stress è stata dimostrata in svariati studi sebbene con livelli di espressione discordanti (Sunkar *et al.*, 2012; Ferdous *et al.*, 2015). Livelli maggiori di questo miRNA riducono la trascrizione di questi enzimi limitando la capacità della pianta di detossificare i composti ossidanti. Partendo dal presupposto che il trattamento con PAW1 si è dimostrato abile nel generare nelle piante meccanismi di difesa indotta, il fatto di ridurre l'azione di questi enzimi potrebbe avere due spiegazioni: da un lato, limitare la degradazione di  $H_2O_2$  facilitandone l'accumulo e quindi favorendo la trasduzione del segnale per l'attivazione di ulteriori risposte di difesa (Chen *et al.*, 1993; Bi *et al.*, 1995) dall'altro, generare il segnale atto a bloccare l'azione di codesti enzimi precedentemente attivati, con l'obiettivo di detossificare i composti ossidanti presenti in PAW e successivamente anche quelli prodotti dalla pianta in risposta allo stress. Infine, la sovraespressione di miR395 e miR399 è stata dimostrata essere correlata alla sotto-regolazione di alcuni geni in condizioni di carenze nutrizionali allo scopo di favorire l'attivazione di trasportatori coinvolti nell'assorbimento del fosfato, solfato e azoto (Matthewman *et al.*, 2012). Questo potrebbe parzialmente spiegare i miglioramenti fisiologici descritti in piante e semi esposti a soluzione PAW ove sono stati registrati incrementi del tasso di crescita (Park *et al.*, 2003; Thirumdas *et al.*, 2018).

Lo studio svolto mediante software psRNAtarget (Dai X. *et al.*, 2011) ha permesso inoltre di verificare il coinvolgimento di miRNA differenzialmente espressi nella via biosintetica degli alcaloidi. Dall'analisi svolta è apparso come mir157d-3p, più presente nella tesi di controllo, abbia tra i propri "target" sequenze codificanti fenilalanina ammonio liasi (TC34956) e calcone flavonone isomerasi (TC06879). Questo risultato, sebbene molto teorico perché influenzato da molteplici variabili, appare in accordo con i valori ottenuti nell'esperimento di espressione genica ove le piantine di *C. roseus* hanno mostrato una maggiore attività del

gene *CrPAL1* a seguito di trattamento con PAW1. Inoltre miR166d e miR172, sottoregolati nella tesi PAW1, hanno evidenziato come possibili “target” rispettivamente il dominio dei fattori di trascrizione AP2 (TC40624), implicato nelle risposte a stress ossidativo, ed il dominio bHLH (TC05059) fattore di trascrizione coinvolto nella via metabolica degli alcaloidi (Yamada *et al.*, 2013).

Sebbene non sia possibile definire con esattezza le precise funzioni metaboliche influenzate dalle diverse popolazioni di miRNA presenti, i risultati ottenuti confermano l’effetto della soluzione PAW1 in pianta evidenziando livelli di regolazione post-trascrizionale differenti tra le tesi soprattutto nelle vie metaboliche coinvolte nei processi di risposta a stress ossidativo.

### **3.2. Interazione pianta-fitoplasma**

L’analisi condotta sull’interazione pianta-fitoplasma ha fatto emergere differenze statisticamente significative tra le popolazioni e le relative concentrazioni di miRNA delle piante infette (WB-PH) e del controllo sano (H); lievi variazioni sono state determinate anche in relazione alla sintomatologia espressa in presenza del fitoplasma. Nello specifico la presenza del patogeno ha generato nelle piante di *C. roseus* una maggior espressione di miRNA appartenenti alle famiglie miR156, miR397a, miR172c, miR398b e miR166 mentre una sotto-regolazione di miR159a, miR168a, miR396a e miR8016. In merito alle differenze riscontrate tra le piante manifestanti sintomi riconducibili a scopazzi (WB) e le piante caratterizzate da spiccata fillodia (PH) sono rinvenuti maggiormente espressi nella prima tesi miR157d-3p e miR168a, mentre nella seconda miR171c; le repliche biologiche della tesi PH hanno inoltre evidenziato una sotto-regolazione di miR162a e miR169h rispetto alla tesi di controllo e alle altre piante infette.

La famiglia miR156, in particolare miR156g-5p, rinvenuta maggiormente espressa in entrambe le tesi infette (WB-PH) ha come “target” diversi geni coinvolti nella biosintesi di brassinosteroidi (Xie *et al.*, 2012). Tali composti sono implicati in un ampio spettro di processi cellulari e fisiologici come lo sviluppo del tubetto pollinico, l’allungamento degli steli, l’inibizione radicale, lo sviluppo dei fiori, la differenziazione dello xilema, la fotosintesi, la biosintesi dell’etilene e numerose regolazioni geniche (Clouse, 2011; Divi *et al.*, 2009). Suddetto miRNA può influenzare la concentrazione di gibberelline nei tessuti

vegetali generando squilibri nello sviluppo come ad esempio una spiccata ramificazione, dovuta alla perdita di dominanza apicale, e un ritardo nella fioritura (Xie *et al.*, 2006; Eviatar-Ribak *et al.*, 2013). E' stato inoltre dimostrato un ruolo sinergico di miR156 e miR157 a livello di geni codificanti fattori di trascrizione del DNA in grado di controllare la morfologia dell'intera pianta (Shikata *et al.*, 2012). In aggiunta, i brassinosteroidi possono indurre nelle piante fenomeni di tolleranza a diversi stress biotici ed abiotici; è stato infatti dimostrato come il perossido di idrogeno utilizzi tali composti per mediare il proprio segnale di difesa e attivare il NADPH ossidasi per la produzione di forme reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di innescare la cascata di fosforilazione proteica (Xia *et al.*, 2009).

Livelli di espressione maggiori di miR156 in piante infette da fitoplasmosi sono stati descritti anche da Ehya *et al.*, 2013 in piante di lima infette da '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' e da Gai *et al.*, 2014 in piante di gelso affette da "yellow dwarf disease".

Studi condotti su *Arabidopsis* e piante di riso hanno dimostrato come alti livelli di miR156, agendo a livello del gene SPL ("squamosa-promoter binding-like proteins"), generino piante di taglia inferiore manifestanti scarsa fioritura, perdita di dominanza apicale e formazione di un numero di foglie maggiore ma molto più piccole (Schwarz *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2006).

Il miR172, anch'esso più espresso nelle tesi WB e PH, ha come "target" diversi fattori di trascrizione del dominio AP2/ERF tra cui APETALA2; l'interazione tra questo miRNA e il dominio AP2/ERF è molto conservato ed è noto essere coinvolto nelle fasi di transizione dello sviluppo determinando la tempistica della fioritura e l'identità degli organi stessi (Zhu *et al.*, 2011). Variazioni nei livelli di espressione di miR156 e miR172 sembrano essere all'origine delle tipiche sintomatologie connesse alla presenza di fitoplasmosi come ad esempio fillodia e sterilità dei fiori in gelso e giuggiolo (Gai *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2016). L'analisi svolta ha determinato in entrambe le tesi infette la sovra-espressione di queste due famiglie di miRNA evidenziando però una maggior presenza di mir172c nelle piante manifestanti sintomi da scopazzi; probabilmente variazioni nei rapporti di espressione tra questi due miRNA possono generare sintomatologie differenti.

Altra famiglia di miRNA maggiormente espressa in presenza del fitoplasma è risultata essere quella di miR397a avente come "target" principale la laccasi, questo enzima comprende tre domini ossidasi "multicopper" i quali catalizzano l'ossidazione di diverse tipologie di substrati fenolici. La laccasi è un'ossidasi che generalmente ossida substrati non fenolici e la

lignina (Bourbonnais & Paice, 1990); la lignificazione è infatti uno dei principali meccanismi messi in atto dalla pianta in presenza dei patogeni (Resende *et al.*, 2002).

Anche miR398b, coinvolto nella regolazione delle superossido dismutasi CSD1, CSD2 e CSD3, implicato nei fenomeni di risposta a stress ossidativo e rinvenuto differenzialmente espresso a seguito di svariati stress di origine biotica ed abiotica, è apparso maggiormente presente nelle due tesi infette (WB, PH; Ferdous *et al.*, 2015). Fluttuazioni dei suoi livelli di espressione sono stati associati alla presenza di diverse tipologie di stress e in questo caso potrebbero evidenziare un'interferenza del fitoplasma sulle normali risposte di difesa messe in atto dalla pianta. Infine, i risultati del sequenziamento hanno evidenziato anche la sovra-espressione, in presenza del patogeno, di miR166d e miR166f confermando quanto descritto da Fan *et al.*, 2015 in piante di paulownia affette da scopazzi. In accordo con l'analisi di predizione dei "target", miR166 risulta associato al fattore di trascrizione REVOLUTA appartenente al dominio proteico HD-Zips III; variazioni dei suoi livelli di espressione sono stati associati ad un anormale sviluppo della pianta caratterizzato da defezioni a livello meristemico con conseguente manifestazione di sintomi quali nanismo e scopazzi (Gai *et al.*, 2014). Il dominio HD-Zips III è inoltre coinvolto nella regolazione del segnale mediato dall'acido abscissico (ABA; Khraiwesh *et al.*, 2012); è stato dimostrato come la presenza del fitoplasma tenda ad incrementare, nelle piante, la concentrazione di ABA con conseguente induzione del dominio HD-Zips III e riduzione della fosforilazione a carico della proteina ribosomica S6. Tale processo porta all'espressione di espansina A10 (EXPA10) e della proteina DWARF4 (DWF4) influenzando la morfologia e la dimensione fogliare (Hur *et al.*, 2015).

Una delle famiglie sottoregolate in presenza del patogeno è risultata quella di miR159 che ha come "target" il fattore di trascrizione MYB coinvolto nei meccanismi di difesa attuati dalle piante e nella regolazione ormonale (Liu *et al.*, 2008). Tale fattore di trascrizione prende parte nella regolazione del segnale mediato da auxina interagendo con i domini carbossilici delle ARFs (fattori di risposta all'auxina, Zhang *et al.*, 2011b). La riduzione dei processi metabolici è una strategia di difesa messa in atto dalle piante in situazioni di stress allo scopo di preservare le risorse e le energie, il segnale auxinico ha un'importanza cruciale nello sviluppo delle piante, nelle risposte di difesa e nel superamento di svariati stress. Il fatto che molti miRNA aventi come "target" TIR1 e ARFs siano influenzati da carenze nutrizionali e

da altri stress suggerisce un loro ruolo chiave nella regolazione del segnale auxinico in risposta a specifici stress ambientali (Sunkar *et al.*, 2012). Livelli di espressione minori di miR159 sono stati rinvenuti anche da Ehya *et al.*, 2013 in piante di lima affette da fitoplasmosi. Altre famiglie di miRNA rinvenute meno espresse nelle piante infette sono risultate quelle di miR168, miR396a e miR8016; miR168 presenta come principale “target” il gene AGO1 codificante l’enzima RNA "slicer", indispensabile nel "pathway" dei miRNA, e coinvolto nella regolazione di diversi processi fisiologici legati allo sviluppo, alla regolazione dei processi biologici, al sistema immunitario ed ai meccanismi di risposta verso gli stimoli esterni (Shen *et al.*, 2014; Rhoades *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2006). Svitati studi hanno dimostrato il coinvolgimento del gene AGO1 nei meccanismi di difesa antivirali (Qu *et al.*, 2008; Várallyay *et al.*, 2010) e nella via di segnalazione PAMP (Li *et al.*, 2010). Una regolazione positiva dei suoi livelli di espressione è stata dimostrata sia a seguito di fenomeni di stress abiotico (Li *et al.*, 2008) sia a seguito di trattamento con jasmonato di metile (Meja) confermandone l’implicazione nei meccanismi adattativi messi in atto dalle piante (Shen *et al.*, 2017). La sottoregolazione di questo miRNA nelle piante di *C. rosues* infette potrebbe essere dovuta al comportamento del fitoplasma, capace di modificare la risposta di difesa messa in atto dalla pianta ospite per facilitare la colonizzazione dei tessuti. Risultati simili sono stati dimostrati anche nell’interazione *Verticillium longisporum* – *Brassica rapa* (Shen *et al.*, 2014) e in piante di paulownia affette da “witches’ broom” (Fan *et al.*, 2015); in entrambi gli esperimenti la presenza dei patogeni ha determinato una sottoregolazione di miR168 rispetto ai controlli sani. E’ plausibile supporre come questo comportamento sia la conseguenza della presenza del patogeno il quale, mediante soppressione dell’attività di miR168 e conseguente sovra-espressione di AGO1 trae beneficio per la sua colonizzazione nelle prime fasi dell’infezione (Shen *et al.*, 2014). Anche miR396a, avente come principali “target” i fattori di regolazione della crescita GRF e coinvolto nel metabolismo dei nutrienti e nel "pathway" etilenico, è stato rinvenuto sottoregolato in presenza del fitoplasma confermando i risultati ottenuti da Ehya *et al.*, 2013 in piante di lima affette da scopazzi. Infine anche miR8016, associato al gene MATE codificante trasportatori trans-membrana implicati in fenomeni di risposta a stress e nell’idrolisi di ATP, è risultato sotto-regolato in presenza del fitoplasma. Questi miRNAs sono solitamente implicati nei meccanismi di risposta delle piante verso stress di origine biotica ed abiotica attivando

diverse vie metaboliche; il fatto che siano stati rinvenuti sotto-regolati in presenza del fitoplasma fa supporre ad un'azione diretta del patogeno sulla loro regolazione allo scopo di limitare le risposte di difesa dell'ospite.

E' stato inoltre possibile delineare lievi differenze, in termini di concentrazioni di miRNA, anche tra le due tesi infette (WB-PH); in particolare a carico di miR157d-3p, miR162a e miR169h più espressi nella tesi WB, e a carico di miR171c più presente nelle repliche della tesi PH. La tipica sintomatologia espressa da piante affette da scopazzi, caratterizzata da perdita di dominanza apicale, sviluppo di gemme ascellari, accorciamento degli internodi e foglie di taglia più piccola sembra essere correlata all'azione di effettori rilasciati dal fitoplasma nell'ospite. In particolare è stato dimostrato come la proteina effettrice codificata dal gene TENGU del fitoplasma "onion yellows" sia capace di generare sintomi da scopazzi e nanismo in piante transgeniche di *Nicotiana benthamiana* ed *Arabidopsis* (Hoshi *et al.*, 2009). Queste proteine effettrici interferendo sui normali processi di segnalazione all'interno delle piante ne alterano la morfologia (Hoshi *et al.*, 2009). Studi condotti da Ehya *et al.*, 2013 hanno evidenziato come in presenza del fitoplasma e dei tipici sintomi da scopazzo fosse possibile rilevare nelle piante livelli di espressione maggiori per diversi miRNA appartenenti alla famiglia miR157. Risultato confermato anche da Shikata *et al.*, 2012 il quale, utilizzando piante transgeniche di *Torenia fournieri* esprimenti miR157b di *Arabidopsis* ha confermato il manifestarsi della tipica sintomatologia avvalorando una relazione diretta tra miR157 e sintomo di scopazzo. L'alta specificità della sequenza bersaglio di miR157 sembra permettergli una regolazione precisa del proprio "target" ossia il gene codificante la proteina di legame SQUAMOSA (SBP) consentendogli di influenzare la normale architettura e morfologia della pianta (Hoshi *et al.*, 2009). La maggior espressione di miR157d-3p nelle piante manifestanti scopazzi in comparazione con quelle della tesi PH risulta in accordo con gli studi sopra citati confermando il ruolo centrale di questa famiglia di "small RNA" nell'espressione della sintomatologia. Sotto-regolato rispetto alla tesi PH è invece apparso miR171c avente come principale "target" geni della famiglia GRAS, numerosa famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione di svariati processi delle piante come la differenziazione e lo sviluppo cellulare (Zhang *et al.*, 2010). Le piante appartenenti alla tesi PH hanno inoltre evidenziato, rispetto alla tesi WB ed ai controlli sani, una minor espressione di miR162a e mir169h aventi come "target" il gene DCL1 (DICER-

LIKE 1) nel primo caso ed i geni CRN e CLV2 codificanti la proteina CORYNE e CLAVATA nel secondo. L'analisi di ontologia genica ha evidenziato come entrambe le proteine sopra citate, regolate da miR169h, controllino importanti processi fisiologici come lo sviluppo e l'accrescimento dei fiori, dei meristemi e di svariati organi. La sottoregolazione di questa famiglia di miRNA, rinvenuta solamente nella tesi PH, insieme ad una minor espressione della famiglia miR157 potrebbero essere correlate alla presenza di fillodia. Studi condotti da Gay et al., 2014 in piante di gelso infette da nanismo giallo e da Shao et al., 2016 in *Ziziphus jujuba* affetto da scopazzi suggeriscono come variazioni nei livelli di espressione di miR156 e miR172 siano responsabili dello sviluppo di strutture fogliari invece che fiorali. In merito a suddetta considerazione i livelli di miR156 sono risultati praticamente identici tra le due tesi infette (WB-PH) mentre miR172 è apparso più espresso nelle piante manifestanti scopazzi. Valutando i risultati ottenuti è possibile ipotizzare come le diverse sintomatologie espresse dalle piante di *C. rosues* infette con il fitoplasma hydrangea 35 possano essere correlate a minime differenze in termini di popolazioni e concentrazioni delle famiglie di miRNA presenti. La tesi WB è risultata caratterizzata da una maggior espressione di miR157 e miR172 mentre la tesi PH dalla sottoregolazione di due famiglie di miRNA ossia miR162 e miR169h.

I livelli di espressione dei miRNA rinvenuti nella prova e lo studio dei relativi geni "target" risultano in accordo con gli studi svolti sull'interazione pianta-fitoplasma presenti in bibliografia. Il lavoro svolto ha evidenziato come, la presenza di diverse famiglie di miRNA in concentrazioni differenti, possano modificare lo sviluppo e la morfologia delle piante sia attraverso un'azione diretta sia influenzando il metabolismo di auxina ed acido abscissico. In particolare è stato possibile dimostrare come piccole variazioni nei livelli di espressione di questi "small RNA" riescano a modificare l'architettura e la fisiologia delle piante generando sintomatologie simili ma allo stesso tempo differenti. Attraverso questo approccio di analisi è stato possibile ipotizzare associazioni tra le famiglie di miRNA presenti e le modificazioni a livello fisiologico/strutturale delle piante in esame.

## CAPITOLO 4

---

### Utilizzo sperimentale di PAW in campo

#### 1. MATERIALI E METODI

##### 1.1. Acqua attivata al plasma

Nel seguente esperimento si è valutata l'efficacia della soluzione PAW in campo. La prova è stata eseguita utilizzando la soluzione denominata PAW1 ottenuta mediante generatore DBD (Capitolo 1, paragrafo 1.1.). Allo scopo di preservarne le caratteristiche e la composizione chimica la soluzione veniva prodotta il giorno precedente ai trattamenti ed immediatamente congelata; in campo si procedeva al suo scongelamento graduale in modo da utilizzarla non appena tornata alla fase liquida. Mantenendo la soluzione ad una temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$  è stato verificato che le forme reattive in essa presenti (RONs) permanevano per circa una settimana.

##### 1.2. Modalità di trattamento

Con l'obiettivo di preservare il più possibile la composizione reattiva di PAW1 e massimizzare il suo effetto all'interno delle piante si è deciso di sperimentare il suo utilizzo mediante endoterapia. Questa tipologia di trattamento permette di rendere direttamente disponibile la soluzione nel sistema vascolare delle viti limitando le interferenze con l'ambiente esterno. Prove preliminari eseguite mediante alcune strumentazioni endoterapiche disponibili in commercio come l'Arbocap® (Ital-agro, Italia) e il BITE® (PAN s.r.l., spin off dell'Università di Padova) sono risultate poco efficienti in vite in termine di quantità di liquido iniettato e tempi di applicazione. Suddette apparecchiature vengono utilizzate per trattamenti su piante ornamentali a grande fusto, e sono risultate troppo invasive per l'applicazione in viticoltura. Sono stati quindi progettati e testati diversi prototipi per individuare quello più idoneo in grado di ridurre al minimo le lesioni a carico dei tessuti legnosi e di velocizzare le tempistiche del trattamento. L'utilizzo di questo nuovo puntale ci ha permesso di eseguire i trattamenti senza l'impiego del trapano; la sua conformazione a cuneo permette di inserirlo nel tronco della vite attraverso l'ausilio di un martello riuscendo a limitare le dimensioni del foro ed eliminando i danni da calore generati dalla rotazione

della punta del trapano (Figura 23). Nei casi in cui l'utilizzo di questo puntale non è risultato possibile, si è proceduto eseguendo un foro di diametro 3 mm mediante trapano ed il liquido è stato iniettato mediante siringa. Quest'ultimo approccio è risultato essere quello più efficiente in termini di quantità di liquido iniettato in unità di tempo ma anche quello più invasivo per i tessuti legnosi della pianta (Figura 23). L'efficienza dei diversi puntali utilizzati e in generale le efficienze riscontrate nei diversi trattamenti sono state valutate misurando la quantità di liquido assorbito dalla piante per unità di tempo.



**Figura 23.** Immagine del foro ottenuto sul tronco di vite mediante l'utilizzo di trapano con punta da 3 mm (A) e attraverso l'impiego del puntale a cuneo (B); sezione di tronco di vite ove è possibile notare l'invasività delle due metodologie impiegate: a sinistra il foro generato dal trapano mentre a destra quello ottenuto mediante l'utilizzo dell'apposito puntale.

Il trattamento veniva eseguito con apposito puntale, dopo aver disinfettato con una soluzione di sali di rame la porzione di tronco selezionata (Figura 24). Terminata l'iniezione si procedeva a disinfettare il puntale e nuovamente la porzione di legno, chiudendo successivamente il foro con cilindretti in cera naturale.



**Figura 24.** A) Applicazione di trattamento endoterapico contenente blu di metilene allo scopo di verificare il suo trasporto acropeto e basipeto. B) Sezione longitudinale della pianta trattata (in rosso il punto di iniezione).

### 1.3. Effetto di PAW sui giallumi della vite

#### 1.3.1. Scelta degli appezzamenti

Allo scopo di verificare l'efficacia del trattamento PAW1 anche in pieno campo, all'interno dell'areale di produzione del Conegliano Valdobbiadene DOCG, sono state selezionate 131 viti, dislocate in 17 vigneti differenti per impianto-età-varietà-ubicazione, che erano state analizzate molecularmente per la presenza di fitoplasmi negli anni precedenti (Zambon, 2014; appendice 6). In ogni appezzamento sono state analizzate un numero variabile di viti (3-7) per verificare la presenza ed il ceppo di fitoplasma, altre sono state selezionate in funzione della presenza dei sintomi caratteristici (appendice 6). Per verificare la presenza dei fitoplasmi si è proceduto all'estrazione del DNA mediante cloroformio/fenolo (Prince *et al.*, 1993; appendice 1) e successiva analisi "nested" PCR/RFLP sul gene ribosomico 16S (appendice 2). Per ogni appezzamento sono state selezionate piante infette e piante sane ove eseguire il trattamento con PAW1 e con ddH<sub>2</sub>O (controlli negativi; Tabella 23). Mediante questo approccio di analisi si è voluto sperimentare l'effetto di PAW1 sia in piante infette da fitoplasmi sia in piante sane allo scopo di determinare possibili effetti benefici di suddetta soluzione sul normale decorso della malattia e nel prevenire nuove infezioni.

<b>n° di piante</b>	<b>Positive all'analisi PCR e/o sintomatiche</b>	<b>Trattamento</b>
76	positive e/o sintomatiche	PAW1
30	negative	PAW1
16	positive e/o sintomatiche	ddH2O
9	negative	ddH2O

**Tabella 23.** Schema sperimentale della prova eseguita in vigneti affetti da giallumi della vite.

Durante ogni anno di sperimentazione (2015<sup>1</sup>-2016-2017-2018) sono stati eseguiti 3 trattamenti endoterapici: metà/fine aprile, a fine di giugno e nell'ultima decade di luglio. Il trattamento è stato eseguito in ciascun appezzamento per due annate consecutive; visto l'elevato numero di viti trattate la prova è stata divisa in due gruppi: dieci vigneti trattati nel 2015 e 2016 e sette nel 2017 e 2018 (appendice 6). Ogni anno su tutte le piante oggetto della sperimentazione sono stati eseguiti rilievi sintomatologici a cadenza mensile (maggio-agosto) e campionamenti fogliari a fine luglio. Durante il sopralluogo di luglio è stata attribuita, per ciascuna vite analizzata, un indice rappresentativo dell'incidenza della sintomatologia connessa alla presenza di fitoplasmosi mediante una scala di gravità da 0 a 5.

### **1.3.2. Identificazione dei fitoplasmi**

Le analisi molecolari per l'individuazione dei fitoplasmi presenti nelle piante campionate in ogni anno sono state eseguite sul DNA totale estratto secondo il protocollo descritto in appendice 1 mediante nested-PCR/RFLP sul gene ribosomico 16S (appendice 2).

### **1.3.3. Elaborazione statistica dei risultati**

I risultati ottenuti dalle analisi molecolari sono stati elaborati statisticamente mediante alcuni parametri di riferimento utilizzati negli studi epidemiologici. Per valutare la presenza di un possibile effetto curativo della soluzione PAW1 è stato calcolato l'odds ratio (OR) (Atman, 1991; Atman *et al.*, 1998). L'Odds di un fenomeno, entro l'ambito di una popolazione, è espresso dal rapporto fra numero di casi in cui il fenomeno si è verificato e numero di casi in

---

<sup>1</sup> *la sperimentazione di campo inerente l'annata 2015 è stata svolta antecedentemente al conseguimento della borsa di dottorato.*

cui il fenomeno non si è verificato. Questo indice può essere utilizzato solamente quando la variabile in oggetto viene espressa in scala dicotomica. Per valutare invece un possibile effetto preventivo del trattamento PAW1 l'analisi statistica dei risultati è stata svolta mediante il calcolo del rischio relativo (RR) secondo il metodo descritto da Atman (1991). Questo indice esprime di quanto è maggiore il rischio di nuove infezioni nei campioni esposti al trattamento (PAW1) rispetto ai non esposti (trattati ddH<sub>2</sub>O). Il valore ottenuto è dato dal rapporto tra incidenza della malattia negli esposti e nei non esposti, è una misura della associazione tra fattore di rischio e malattia. In entrambe le elaborazioni statistiche i test di significatività per il calcolo del “p-value” sono stati svolti in accordo con Sheskin 2004.

## **1.4. Effetto di PAW sulla produzione**

### **1.4.1. Scelta degli appezzamenti**

Con l'obiettivo di verificare se il trattamento con PAW1 possa migliorare la fisiologia della pianta e dunque generare miglioramenti quanti-qualitativi nella produzione d'uva in quattro dei vigneti sopra citati è stata eseguita una valutazione agronomica. Sono state selezionate per ciascun appezzamento 20 viti disposte nelle stesse situazioni pedo-climatiche all'interno del vigneto, della stessa età e con il medesimo stato sanitario. In uno dei quattro vigneti le piante sono state 40 per ottenere un numero totale di piante più rappresentativo per le analisi statistiche (Tabella 24). In quest'ultimo caso, delle 40 viti selezionate, 20 (10 PAW1, 10 ddH<sub>2</sub>O) erano situate in cima ad una collina e le altre 20 nella porzione più bassa; le parcelle sono quindi state designate 16a e 16b (Tabella 24). Nel mese di dicembre 2017 tutte le piante sono state potate allo stesso modo (Guyot) lasciando in ciascun appezzamento lo stesso numero di gemme per pianta (Figura 25). Le piante sono state suddivise nelle due tesi PAW1 e ddH<sub>2</sub>O. I trattamenti sono stati eseguiti ad aprile, giugno e fine di luglio 2018.

Vigneto n°	Forma di allevamento	n° di gemme	PAW n° di piante	H <sub>2</sub> O n° di piante
4	Guyot	30	10	10
5	Guyot	24	10	10
12	Guyot	30	10	10
16 a	Guyot	30	10	10
16 b	Guyot	30	10	10

**Tabella 24.** Schema sperimentale della prova di valutazione agronomica.



**Figura 25.** Viti selezionate per la prova agronomica nell'appezzamento n° 16a.

### 1.4.2. Valutazione dei parametri agronomico/produttivi

Allo scopo di definire possibili effetti benefici del trattamento con PAW1 in termini di quantità e qualità della produzione nelle piante selezionate sono stati valutati i seguenti parametri: i) numero di grappoli per pianta e ii) peso di 100 acini / tesi / campo. Questi valori sono generalmente utilizzati per quantificare le rese agronomico/produttive in modo non distruttivo; si è scelto di valutare il peso di 100 acini (10 acini per ciascuna delle 10 piante per tesi) partendo dalla considerazione che la variabilità del peso di un singolo acino è minore di quella di un grappolo (Fidelibus *et al.*, 2006).

Sul mosto ottenuto dalla pigiatura dei cento acini sono state effettuate le analisi per verificare l'acidità reale o pH (GUCE, 1990), l'acidità totale (GUCE, 1990) ed il grado Babo per la concentrazione zuccherina ottenuto mediante rifrattometro (PCE-Oe, PCE Italia).

### **1.4.3. Elaborazione statistica dei risultati**

Le differenze riscontrate nella prova agronomica tra le piante trattate PAW1 e i controlli trattati con ddH<sub>2</sub>O sono state elaborate statisticamente mediante calcolo dell'errore standard e test "T-student" (Fisher, 1925). Inoltre, allo scopo di valutare l'attendibilità dei risultati, è stata analizzata statisticamente la loro distribuzione mediante la realizzazione dell'istogramma "a scatola a baffi" ("box and whiskers plot") come descritto da Tukey, 1977.

## **2. RISULTATI**

### **2.1. Trattamento endoterapico**

La modalità di trattamento utilizzata si è dimostrata molto efficace in termini di assorbimento da parte delle piante trattate (20 ml/15 min). Durante gli anni della sperimentazione è stato possibile verificare come le ore più fresche della giornata, prima mattina o tardo pomeriggio, rappresentino l'arco temporale più idoneo per eseguire l'iniezione. Paragonando i tre trattamenti eseguiti nel corso della stagione quello nel mese di aprile è risultato il più efficiente, sebbene le piante presentassero un LAI (indice di area fogliare) minore; in generale è stato possibile iniettare per ogni singolo trattamento, un quantitativo medio pari a 20 ml di preparato. Saltuariamente il trattamento mediante l'apposito puntale a cuneo è risultato di difficile applicazione allungando i tempi di lavoro; in questi casi si è proceduto eseguendo, mediante il trapano, un foro da 3 mm e successivamente iniettando il liquido attraverso una semplice siringa di plastica.

### **2.2. Effetto di PAW sui giallumi della vite**

E' stato possibile osservare nelle piante trattate con la soluzione PAW1, a differenza dei controlli negativi e dei testimoni non trattati, una lieve riduzione dei sintomi associati alla presenza di fitoplasmii e soprattutto un lieve ritardo nella loro comparsa che in alcuni casi ha

consentito alle piante di portare a raccolta il proprio carico produttivo. Nelle viti infette e trattate PAW1 si è osservata una riduzione del numero di piante positive all'analisi PCR. A seguito di trattamento biennale il 35,5% delle piante trattate (27/76) sono risultate negative alle analisi molecolari a differenza dei controlli trattati ddH<sub>2</sub>O ove è stata registrata una riduzione pari al 12,5 % (2/16; Tabelle 25 e 26).

Varietà	Vite	Anno 0		1° anno di trattamento		2° anno di trattamento	
		gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR
CH	1C	5	POS.	4	NEG.	4,5	POS.
	3C	2	POS.	2	POS.	5	POS.
	4C	3	POS.	3	NEG.	5	POS.
	9C	3	POS.	3	POS.	2	POS.
	10C	0	POS.	0	NEG.	0	NEG.
	11C	3	POS.	3	POS.	5	POS.
	12C	4	POS.	4	POS.	5	POS.
	13C	4	POS.	4	POS.	MORTA	/
	14C	4	POS.	5	POS.	MORTA	/
GL	2B	1	POS.	0	NEG.	0	NEG.
	3B	2	POS.	1	POS.	1,5	POS.
	8B	3	SINT.	3	POS.	3	POS.
	9B	2	SINT.	2	POS.	3	POS.
GL	1E	5	POS.	5	POS.	3	NEG.
	4E	2	SINT.	2	POS.	2	POS.
GL	1A	4	POS.	3,5	NEG.	1	NEG.
	3A	3	POS.	0	NEG.	0	NEG.
	9A	3	SINT.	1	POS.	1	POS.
	10A	4	SINT.	2	POS.	3	POS.
	11A	4	SINT.	0	NEG.	1	NEG.
	12A	3	SINT.	2	?	MORTA	/
GL	2Z	1,5	POS.	1,5	NEG.	0	NEG.
	3Z	1	POS.	0	POS.	0	NEG.
	4Z	2	POS.	1	POS.	0	POS.
GL	1Y	2	POS.	1	NEG.	0	POS.
	4Y	2	POS.	1	NEG.	0	POS.
	6Y	1	SINT.	1	POS.	0	NEG.
GL	1D	1	SINT.	0	NEG.	0	POS.
	2D	0	POS.	0	POS.	0	POS.
CH	6D	4	POS.	4	POS.	MORTA	/
	7D	4	POS.	/	/	MORTA	/
	9D	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	10D	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.
GL	1H	1	POS.	0	POS.	0	POS.
	2H	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.

	4H	2,5	POS.	3	POS.	2	POS.
GL	1F	2	SINT.	0	NEG.	0	POS.
	2F	1	POS.	0	NEG.	0	NEG.
	4F	1	SINT.	0	NEG.	0	POS.
	5F	1	POS.	0	POS.	0	POS.
GL	1L	3	POS.	0	POS.	0	POS.
	2L	3	POS.	0	NEG.	0	NEG.
	4L	3	SINT.	4	POS.	0	NEG.
	5L	3	SINT.	0	POS.	0	NEG.
	6L	3	SINT.	3	NEG.	0	NEG.
GL	1N	3	POS.	4	NEG.	3	POS.
	2N	3	POS.	0	POS.	3	POS.
	3N	3	POS.	4,5	POS.	2	POS.
	4N	3	SINT.	0	POS.	3	POS.
	5N	3	SINT.	0	NEG.	1	POS.
GL	1M	3	POS.	1	POS.	0	POS.
	3M	3	POS.	1	NEG.	0	POS.
	4M	3	SINT.	1	POS.	0	NEG.
	5M	2	SINT.	1	POS.	0	POS.
	7M	2	SINT.	1	POS.	0	NEG.
GL	2Q	3	POS.	0	POS.	0	NEG.
	4Q	2	SINT.	0	POS.	0	NEG.
	6Q	2	SINT.	0	POS.	0	NEG.
GL	1J	3	POS.	1	POS.	0	NEG.
	3J	4	POS.	1	/	MORTA	/
	4J	2	SINT.	1	POS.	0	NEG.
	5J	2	SINT.	1	NEG.	0	NEG.
	6J	2	SINT.	1	POS.	0	NEG.
	8J	2	SINT.	1	POS.	0	VII
GL	1K	3	POS.	1	POS.	2	POS.
	3K	3	SINT.	1	NEG.	0	POS.
	4K	3	SINT.	1	/	MORTA	/
	5K	3	SINT.	1	POS.	0	NEG.
	6K	3	SINT.	1	POS.	0	POS.
	7K	2	SINT.	3	POS.	2	POS.
GL	BR1	2	POS.	1	POS.	0	POS.
	BR2	2	SINT.	1	POS.	0	POS.
	BR3	2	POS.	1	POS.	0	POS.
	BR4	2	SINT.	1	NEG.	0	POS.
	BR5	2	POS.	1	POS.	0	POS.
	BR6	2	SINT.	1	POS.	0	POS.

**Tabella 25.** Effetto del trattamento biennale con PAW1 in viti infette da fitoplasmi. CH: varietà Chardonnay; GL: varietà Glera. L'incidenza dei sintomi è espressa attraverso una scala di gravità da 0 a 5 e si riferisce alla sintomatologia presente nelle piante nei primi giorni di agosto di ciascun anno di sperimentazione. In evidenza le piante che sono risultate negative all'analisi PCR al termine della sperimentazione.

Varietà	Vite	Anno 0		1° anno di trattamento		2° anno di trattamento	
		gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR
CH	2C	5	POS.	5	NEG.	4,5	POS.
	5C	5	POS.	5	POS.	5	POS.
	8C	3	POS.	3	POS.	MORTA	/
GL	1B	1	POS.	1	POS.	2	POS.
	7B	3	SINT.	3	POS.	3,5	POS.
	10B	3	SINT.	3	POS.	0	POS.
GL	2A	4	POS.	2,5	NEG.	1	POS.
GL	1Z	2	POS.	0	POS.	1	NEG.
CH	4D	4	POS.	2	POS.	2	NEG.
GL	6H	1	SINT.	0	POS.	0	POS.
	8H	1	POS.	0	POS.	0	POS.
GL	8F	1	POS.	0	POS.	0	POS.
GL	3L	3	POS.	0	NEG.	0	POS.
GL	2M	3	POS.	1	POS.	0	POS.
GL	2J	3	POS.	1	POS.	5	POS.
GL	2K	1	POS.	1	POS.	2	POS.

**Tabella 26.** Effetto del trattamento biennale con il controllo ddH<sub>2</sub>O in viti infette da fitoplasmi. CH: varietà Chardonnay; GL: varietà Glera. L'incidenza dei sintomi è espressa attraverso una scala di gravità da 0 a 5 e si riferisce alla sintomatologia espressa dalle piante nei primi giorni di agosto di ciascun anno di sperimentazione. In evidenza le piante che sono risultate negative all'analisi PCR al termine della sperimentazione.

Come è possibile vedere nelle tabelle 25 e 26 alcune piante fortemente sintomatiche all'anno zero sono morte durante i due anni di sperimentazione sia nel caso fossero state trattate con la soluzione PAW1 (vite 4K, 3J, 6D, 7D, 12A, 13C e 14C) sia con ddH<sub>2</sub>O (8C) testimoniando la gravità delle malattie associate alla presenza di fitoplasmi. Questo risultato esprime in linea generale il comportamento riscontrato durante la sperimentazione ove piante severamente colpite non hanno quasi mai evidenziato miglioramenti connessi al trattamento con PAW1; lievi remissioni e/o ritardi nell'espressione dei sintomi sono stati invece registrati in piante manifestanti sintomatologie meno severe. L'analisi statistica ha fatto registrare un indice "odds ratio" pari a 3,93; questo valore indica che le piante trattate con PAW1 evidenziano una predisposizione al "risanamento" 3,93 volte superiore ai controlli con una significatività statistica per  $p < 0,05$ . Per quanto riguarda invece la prova condotta sulle piante sane, ove si è voluta valutare la capacità del trattamento nel prevenire nuove infezioni, è stato possibile registrare come delle 30 piante sane trattate con PAW1 all'anno zero, 16 siano risultate negative all'analisi PCR a distanza di due anni (Tabella 27).

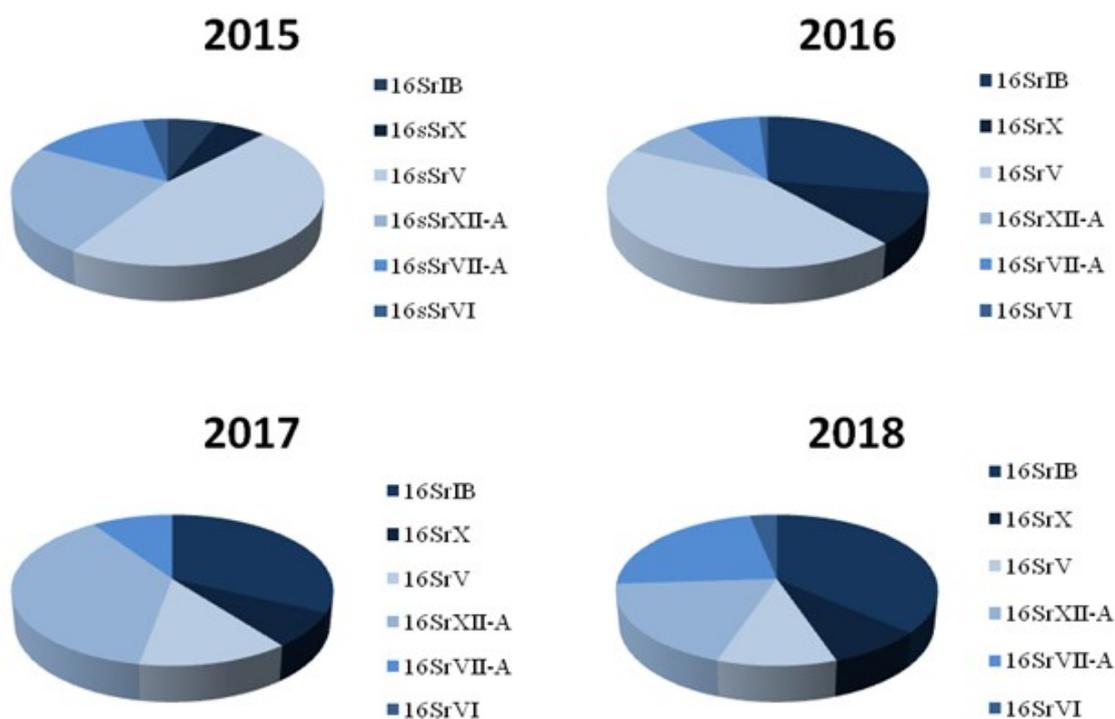
Varietà	Vite	Anno 0		1° anno di trattamento		2° anno di trattamento	
		gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR
CH	6C	0	NEG.	1	NEG.	1	POS.
	7C	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
	5B	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
	6B	0	NEG.	3,5	NEG.	3,5	NEG.
GL	11B	0	NO SINT.	0	POS.	0	POS.
	12B	0	NO SINT.	0	NEG.	2	NEG.
	13B	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
GL	2E	4	NEG.	3,5	NEG.	3	POS.
GL	5A	0	NEG.	5	NEG.	1	NEG.
	6A	0	NEG.	2,5	NEG.	0	NEG.
	7A	0	NO SINT.	1	NEG.	0	NEG.
	8A	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	13A	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	14A	0	NO SINT.	4	POS.	4	POS.
GL	6Z	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
	7Z	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
GL	2Y	0	NEG.	0	POS.	0	POS.
	5Y	0	NEG.	1	NEG.	5	POS.
GL	3D	0	NO SINT.	0	POS.	0	NEG.
CH	5D	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
GL	3H	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
	5H	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
	7H	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
GL	3F	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
GL	7L	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
GL	7N	0	NO SINT.	0	NEG.	2	POS.
GL	6M	0	NO SINT.	1	NEG.	0	NEG.
GL	5Q	0	NO SINT.	0	NEG.	0	POS.
GL	7J	0	NO SINT.	1	NEG.	1	NEG.

**Tabella 27.** Effetto del trattamento biennale con PAW1 in viti sane allo scopo di limitare le nuove infezioni. CH: varietà Chardonnay; GL: varietà Glera. L'incidenza dei sintomi è stata espressa attraverso una scala di gravità da 0 a 5 e si riferisce alla sintomatologia espressa dalle piante nei primi giorni di agosto di ciascun anno di sperimentazione. In evidenza le piante che sono risultate positive all'analisi PCR al termine della sperimentazione (nuove infezioni).

Diverso è stato il comportamento evidenziato nei testimoni trattati ddH<sub>2</sub>O ove di 9 piante selezionate ben 6 sono risultate positive a distanza di un biennio (Tabella 28). Questi dati dimostrano la difficoltà nel prevenire l'insorgere di nuove infezioni da fitoplasmi, procarioti trasmessi da diverse specie di insetti vettori.

Varietà	Vite	Anno 0		1° anno di trattamento		2° anno di trattamento	
		gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR
GL	4B	0	NEG.	0	POS.	1	POS.
GL	3E	3	NEG.	2,5	POS.	3	POS.
GL	4A	0	NEG.	2	NEG.	1	POS.
	15A	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
GL	5Z	0	NEG.	0	NEG.	0,5	POS.
GL	3Y	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
CH	8D	0	NEG.	0	NEG.	0	POS.
GL	7F	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
GL	6N	0	NEG.	0	POS.	1	POS.

**Tabella 28.** Effetto del trattamento biennale con il controllo ddH<sub>2</sub>O in viti sane. CH: varietà Chardonnay; GL: varietà Glera. L'incidenza dei sintomi è stata espressa attraverso una scala di gravità da 0 a 5 e si riferisce alla sintomatologia espressa dalle piante nei primi giorni di agosto di ciascun anno di sperimentazione. In evidenza le piante che sono risultate positive all'analisi PCR al termine della sperimentazione (nuove infezioni).

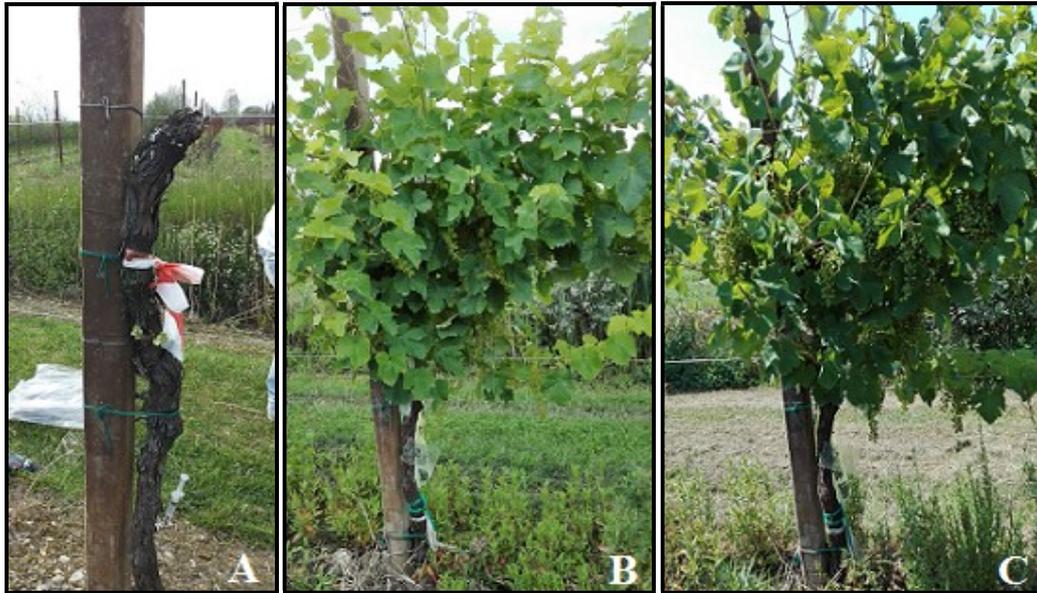


**Grafico 16.** Rappresentazione grafica della presenza percentuale dei diversi ceppi di fitoplasmici identificati durante la sperimentazione di campo.

L'analisi statistica ha evidenziato un indice di rischio relativo (RR) di 0,70. Questo valore, quando superiore a 1, indica che il fattore considerato comporta un aumento del rischio, mentre se inferiore che la variabile studiata risulta essere un fattore di protezione. Sebbene suddetto indice indichi la predisposizione del trattamento a limitare l'insorgenza della malattia, l'analisi statistica non ha permesso di evidenziare differenze significative tra le tesi in oggetto a causa del numero limitato di controlli negativi. Per definire la positività o negatività delle piante analizzate si è deciso di valutare la presenza/assenza del fitoplasma, non identificando come infette solamente le piante positive a flavescenza dorata (FD) e legno nero (BN) in accordo con recenti indagini che hanno dimostrato una riduzione della presenza di FD e BN ed un incremento della presenza di altri fitoplasmi. Valutando nel complesso le analisi PCR condotte nei quattro anni di sperimentazione nelle piante oggetto del trattamento si è evidenziata una drastica riduzione della presenza di FD che inizialmente rappresentava circa il 47% della totalità dei campioni positivi mentre al termine della prova si è attestato intorno al 10% (Grafico 16). Comportamento diverso è stato invece riscontrato per BN ove sono state determinate percentuali di presenza pressochè uguali in tutte le annate (Grafico 16). Nell'ultimo anno di analisi, sono stati registrati incrementi della presenza di fitoplasmi 16SrVII-A e 16SrI-B (Zambon *et al.*, 2018).

### **2.3. Effetto di PAW sulla produzione**

Come anticipato precedentemente, l'effetto del trattamento PAW1 sulla produzione delle viti sottoposte allo studio è stato valutato in termini di numero di grappoli per pianta e peso di 100 acini. Si è scelto di svolgere questo studio allo scopo di poter valutare oggettivamente i miglioramenti visivi riscontrati durante i quattro anni di sperimentazione svolta sui giallumi della vite. Durante tale prova infatti è stato possibile riscontrare, in alcune delle piante trattate con PAW1 e severamente stentate ad inizio stagione, un netto miglioramento della loro fisiologia risultante a fine stagione in un LAI (indice di area fogliare) e in un quantitativo produttivo nella norma (Figura 26).



**Figura 26.** Vite cv. Glera (2B) nell'annata 2016 trattata con PAW1. A) Situazione in data 20.04 quando sono stati iniettati 20 ml di soluzione; B) situazione in data 17.06 quando sono stati iniettati ulteriori 20 ml di soluzione; C) situazione in data 20.07.

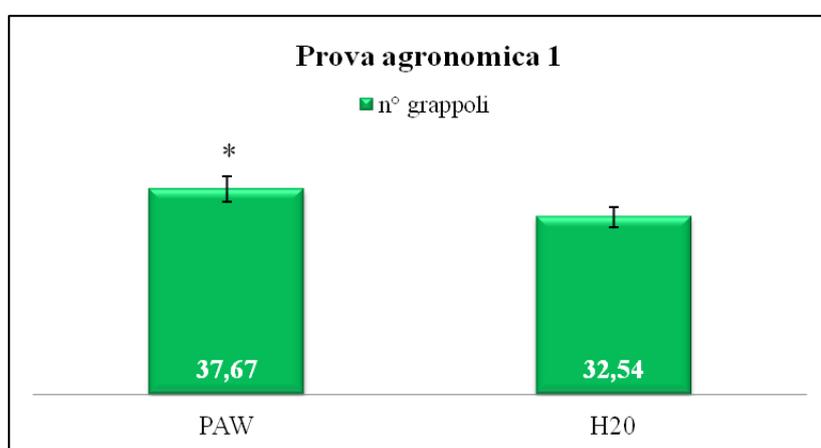
Come testimonia la figura 26 la vite 2B in data 20.04.2016 appariva fortemente stentata ed inoltre, a differenza delle altre piante presenti in vigneto, non evidenziava alcun germoglio sebbene il pianto della vite in tale annata fosse avvenuto molto precocemente. A seguito dei trattamenti endoterapici con PAW1 si è assistito ad un graduale miglioramento del suo stato fisiologico che ha portato ad una produzione quasi regolare. Fenomeni simili a quanto descritto sono stati osservati in altre viti durante i quattro anni di sperimentazione e proprio per tale motivo si è impostata la prova agronomica. I risultati ottenuti nel 2018 hanno evidenziato nella totalità degli appezzamenti selezionati, un numero maggiore di grappoli nelle piante trattate con PAW1 rispetto ai controlli non trattati; inoltre, in tutti i vigneti il peso di 100 acini (risultato rappresentativo di tutte le piante di ogni tesi) è risultato essere superiore nella tesi PAW1 (Tabella 29).

Vigneto	n° grappoli per pianta				Peso di 100 acini (gr)	
	PAW	SE	H2O	SE	PAW	H2O
4	27	±1,63	25	±1,76	215	198
5	25	±2,9	22	±2,30	226	196
12	52	±3,5	45	±2,9	215	198
16a	37	±5,6	33	±3,5	226	196
16b	45	±4,87	36	±5,09	193	188

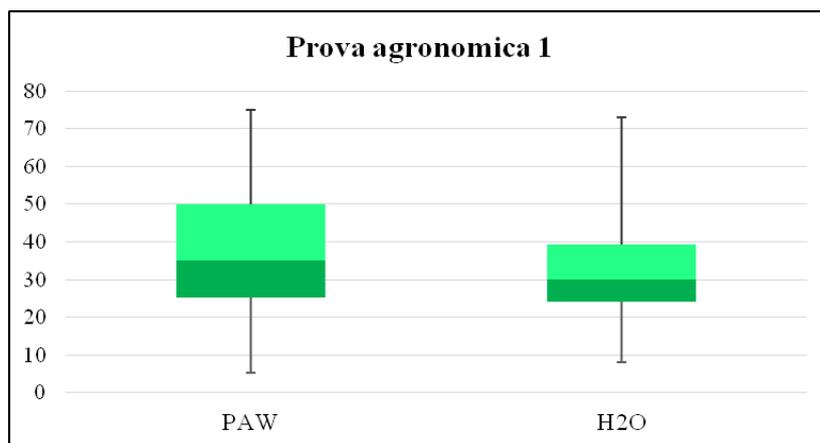
**Tabella 29.** Numero medio di grappoli con relativo errore standard (SE) e peso di cento acini.

Allo scopo di fornire un quadro generale dei risultati ottenuti sono stati unificati i valori riscontrati in ciascun appezzamento comparando nella totalità le produzioni delle piante sottoposte a trattamento con PAW1 rispetto ai controlli trattati con ddH<sub>2</sub>O (Grafici 17 e 19). Per verificare la significatività dei risultati ne è stata analizzata statisticamente la distribuzione mediante istogrammi "a scatola a baffi" (Grafici 18 e 20).

Il grafico 17 evidenzia come, nel complesso, le piante trattate con soluzione PAW1 abbiano prodotto in media un numero maggiore di grappoli (37,67) rispetto ai controlli trattati con ddH<sub>2</sub>O (32,54); questi valori sono risultati statisticamente significativi a seguito dell'analisi mediante test "T-student" per  $p < 0,05$ .



**Grafico 17.** Confronto delle medie produttive, in termini di grappoli prodotti, tra la totalità delle piante trattate con PAW1 ed i relativi controlli trattati ddH<sub>2</sub>O con relativi errori standard (SE). (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ )



**Grafico 18.** Rappresentazione sintetica della distribuzione dei risultati ottenuti nella prova agronomica inerente il numero di grappoli per tesi (PAW1-ddH<sub>2</sub>O).

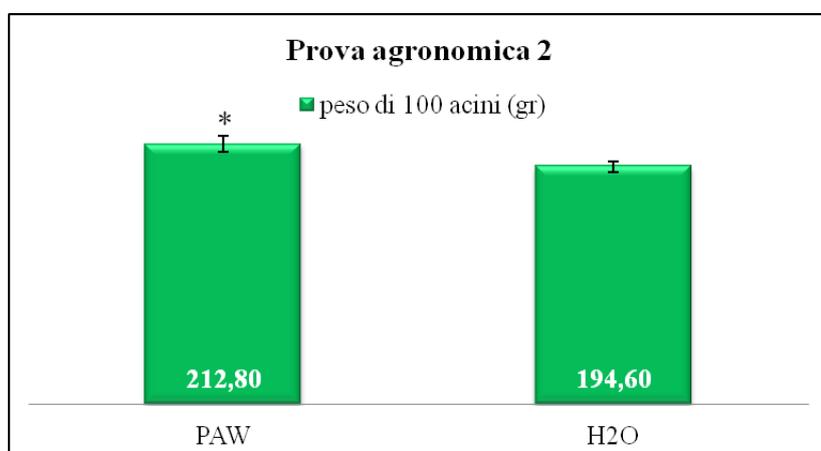
Il grafico 18 rappresenta la distribuzione statistica dei valori ottenuti; la linea interna alla scatola rappresenta la mediana della distribuzione mentre le linee estreme del box rappresentano il primo e il terzo quartile. La distanza tra il terzo (Q3) e il primo quartile (Q1) è una misura della dispersione della distribuzione e rappresenta la porzione di grafico in cui sono comprese il 50% delle osservazioni. Conseguentemente, più piccolo risulta l'intervallo interquartilico (box) più le osservazioni ottenute risulteranno concentrate intorno alla mediana. Le distanze tra ciascun quartile e la mediana forniscono informazioni relativamente alla forma della distribuzione; se una distanza è diversa dall'altra allora la distribuzione è asimmetrica. Infine, le linee che si allungano dai bordi della scatola ("baffi") individuano gli intervalli in cui sono posizionati i valori rispettivamente minori di Q1 e maggiori di Q3; i punti estremi dei "baffi" evidenziano i valori adiacenti superiori e inferiori. Con il termine valore adiacente superiore (VAS) si indica il valore maggiore tra le osservazioni che risulta minore o uguale a  $Q3 + 1,5(Q3 - Q1)$ , mentre con il termine valore adiacente inferiore (VAI) il valore più piccolo tra le osservazioni che risulti maggiore o uguale a  $Q1 - 1,5(Q3 - Q1)$ .

Analizzando il grafico è possibile notare come i valori ottenuti nella tesi trattata con PAW1 risultino più dispersi rispetto a quelli dei controlli negativi; in particolare il trattamento ha modificato la distribuzione dei rilievi ottenuti (in questo caso il numero di grappoli per pianta) verso valori più elevati (porzione del box verde chiaro) nella tesi PAW1 rispetto al controllo negativo. All'interno del box (50% delle osservazioni ottenute) la mediana risultante nella tesi PAW1 è maggiore di quella ottenuta nel controllo evidenziando la

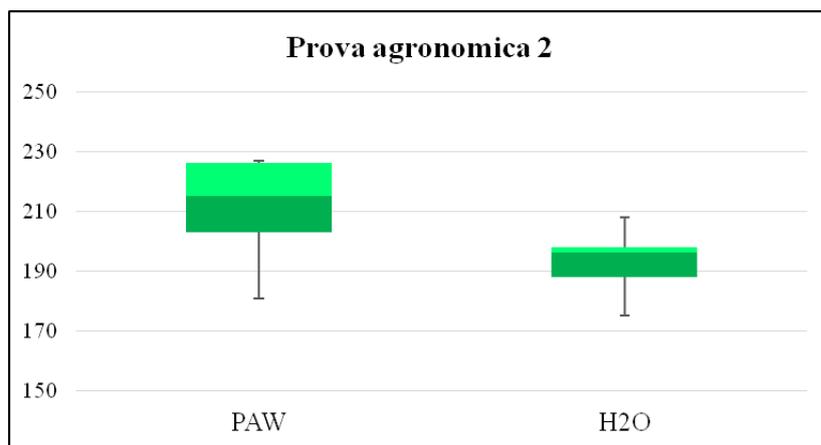
presenza di un maggior numero di osservazioni nel terzo quartile (box verde chiaro) rispetto al primo (box verde scuro). Questa distribuzione conferma l'effetto positivo di PAW1 evidenziando come i risultati ottenuti a seguito del trattamento, risultino maggiormente asimmetriche verso valori più elevati rispetto ai controlli negativi.

Per quanto riguarda invece i risultati ottenuti dalla comparazione del peso di 100 acini è stato possibile determinare, in ognuno dei 5 appezzamenti selezionati, un incremento significativo nella tesi PAW1 (Tabella 29). Raggruppando tutti i dati acquisiti nei singoli vigneti è possibile notare come la tesi PAW1 evidenzi un valore medio del peso di 100 acini pari a 212,80 gr in confronto con il controllo attestatosi a 194,60 gr (Grafico 19). Mediante test "T-student" e calcolo dell'errore standard è stato possibile determinare come tale differenza sia risultata statisticamente significativa (Grafico 19).

L'analisi della distribuzione dei dati ottenuti ha confermato l'effetto del trattamento evidenziando come il box inerente la tesi PAW1 risulti nettamente superiore a quello del relativo controllo manifestando forte asimmetria verso valori più elevati (Grafico 20).



**Grafico 19.** Confronto delle medie produttive, in termini di peso di 100 acini, tra la totalità delle piante trattate con PAW1 e i relativi controlli trattati ddH<sub>2</sub>O con relativi errori standard (SE). (\* = statisticamente significativo per  $p < 0,05$ ).



**Grafico 20.** Rappresentazione sintetica della distribuzione dei risultati ottenuti nella prova agronomica inerente il peso di 100 acini (PAW1-ddH<sub>2</sub>O).

L'ultima prova è stata effettuata sul mosto ottenuto dai 100 acini precedentemente valutati per la prova agronomica ove sono state eseguite le principali analisi chimiche per determinarne l'acidità reale, l'acidità totale e il grado Babo. I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna differenza tra le due tesi attestandosi su valori praticamente identici. Questo risultato testimonia come l'effetto di PAW1, nonostante abbia aumentato lievemente i parametri produttivi, non abbia intaccato la qualità dell'uva (Tabella 30).

Vigneto	Acidità reale (pH)		Grado Babo		Acidità totale (gr/L)	
	PAW	H <sub>2</sub> O	PAW	H <sub>2</sub> O	PAW	H <sub>2</sub> O
4	3,208	3,230	13,5	13,5	6,8	7,3
5	3,297	3,250	14,2	13,4	5	5,5
12	3,139	3,233	12,8	13,2	7,8	7,2
16a	3,230	3,223	15,20	15,40	6,8	6,70
16b	3,225	3,220	15,00	14,80	6,8	7,1

**Tabella 30.** Profili chimici dei mosti ottenuti dalle due tesi in studio (PAW1, ddH<sub>2</sub>O).

### 3. DISCUSSIONE

Il ciclo biologico delle malattie associate alla presenza di fitoplasmi comprende un elevato numero di piante ospiti e di insetti vettori risultando complesso e di difficile gestione; proprio per questo motivo le principali strategie di controllo non sono dirette contro il patogeno ma bensì mirano all'eliminazione delle piante sintomatiche/infette e all'esecuzione di trattamenti insetticidi contro i vettori (Belli *et al.*, 2010; Weintraub & Wilson, 2009). Punto focale per la gestione di queste malattie è rappresentato dall'utilizzo di materiale di propagazione sano, generalmente ottenuto mediante l'ausilio di diverse tecniche quali ad esempio coltura di apici meristematici (Green *et al.*, 1989; Wongkaew & Fletcher, 2004; Chalak *et al.*, 2005), termoterapia (Green *et al.*, 1989; Bianco *et al.*, 2000; Borgo *et al.*, 1999; Bertaccini *et al.*, 2001), embriogenesi somatica da tessuti fogliari (Parmessur *et al.*, 2002), organogenesi (Wongkaew & Fletcher, 2004), culture di cellule staminali (Dai *et al.*, 1997), microinnesto (Chalak *et al.*, 2005), trattamento mediante antibiotici (Green *et al.*, 1989; Davis & Clark, 1994) e infine trattamento crioterapico (Wang & Valkonen, 2008). Oltre a queste tecniche, utilizzate per limitare la diffusione di materiale di propagazione infetto, le uniche strategie di controllo messe in atto in campo sono basate sull'esecuzione di trattamenti chimici contro gli insetti vettori e nel caso del Legno nero, dalla gestione delle piante spontanee e dall'inerbimento del cotico erboso (Angelini *et al.*, 2018). L'uso di questi composti genera tuttavia una serie di effetti indesiderati come tossicità residua nell'ambiente, riduzione dell'entomofauna utile e incremento dei costi di produzione per le aziende. Allo scopo di definire strategie di controllo ecosostenibili ed efficienti sono state sperimentate nuove tecnologie come l'utilizzo di piante transgeniche e l'impiego di elicitori atti a stimolare le risposte di difesa in pianta (Laimer *et al.*, 2009; Romanazzi *et al.*, 2009, 2013; Bianco *et al.*, 2011).

Vista la natura fortemente reattiva ed instabile di PAW1 si è scelto di eseguire i trattamenti mediante endoterapia limitando il più possibile il contatto tra la soluzione e l'ambiente esterno; agendo in questo modo è stato possibile preservare le caratteristiche chimico-fisiche della soluzione rendendola prontamente disponibile nei vasi xilematici delle viti non appena scongelata. Dal punto di vista applicativo risulterebbe sicuramente più vantaggioso eseguire il trattamento mediante l'ausilio di un normale atomizzatore ma questo vorrebbe dire esporre la soluzione PAW1 a degradazione prima che possa essere assorbita dai tessuti fogliari delle

piante. Il trattamento endoterapico ha evidenziato un'ottima efficienza durante tutti gli anni di sperimentazione consentendoci di iniettare un quantitativo medio per applicazione pari a ~ 20 ml; nonostante questo la sua applicazione su larga scala risulta molto difficile a causa del tempo necessario per l'applicazione, approssimativamente pari a 10/15 minuti per pianta. Inoltre, tra un trattamento e l'altro risulta di fondamentale importanza la disinfezione del puntale e di tutta la strumentazione usata allo scopo di non facilitare la già complicata gestione del complesso del mal dell'esca qualora presente in campo.

I risultati della sperimentazione condotta sulle viti infette da fitoplasmi hanno evidenziato una predisposizione al risanamento maggiore nella tesi trattata PAW1 rispetto ai controlli trattati con acqua. Alcuni gruppi di ricerca (Romanazzi *et al.*, 2013) hanno evidenziato, attraverso uno studio condotto per 4 anni consecutivi, che l'applicazione intensa di induttori di resistenza (13 trattamenti/anno) genera una riduzione del numero di viti infette da fitoplasmi variabile dal 35,1%  $\pm$  4,7, per quanto riguarda il chitosano, al 56,7%  $\pm$  7,8 impiegando benztiodiazolo (BTH). I controlli negativi in tale prova hanno manifestato una naturale predisposizione al risanamento del 26,4%  $\pm$  6,9, comportamento analogo a quello rinvenuto in questa prova. Gli autori evidenziano come il trend riscontrato nei controlli negativi sia molto variabile essendosi attestato al 37,5% nell'annata 2007 per poi scendere al 8,3% due anni dopo (2009). Questo fenomeno, denominato "recovery", appare influenzato da differenti fattori (Kunze, 1976) quali la predisposizione varietale (Bellomo *et al.*, 2007; Garau *et al.*, 2007; Romanazzi *et al.*, 2007), la combinazione innesto/portinnesto (Romanazzi & Murolo, 2008) e le condizioni ambientali, senza tralasciare l'azione degli insetti vettori che possono reinfettare le piante. Gli autori associano l'elevata percentuale di piante di controllo risanate nell'anno 2007 all'andamento climatico caratterizzato da una stagione fortemente calda ed asciutta che ha registrato il 50% di precipitazioni in meno rispetto alle medie del periodo (Romanazzi *et al.*, 2013). Analizzando nel complesso i risultati ottenuti dagli autori nei quattro anni è possibile notare come il risanamento registrato nelle piante di controllo si sia attestato quasi ogni anno (ad eccezione dell'annata 2009) su valori pari al 50% di quelli espressi dal miglior induttore di resistenza testato (BTH). Comparando questi dati con quelli ottenuti nella prova qui descritta è possibile evidenziare come anche a seguito di trattamento con PAW1 il numero delle piante risanate si sia attestato su valori doppi rispetto al controllo negativo (34,3  $\pm$  1,25 contro 15,5  $\pm$  3)

seppur attraverso sole 3 applicazioni/anno rispetto alle 13 eseguite nello studio sopra citato. I risultati ottenuti in questa prova testimoniano quindi il possibile effetto benefico del trattamento PAW1 nel favorire il naturale processo di risanamento o "recovery" manifestato dai controlli negativi. In merito invece alla prova sulle piante sane volta a verificare una possibile azione preventiva di PAW1, sebbene la tesi in esame abbia manifestato una predisposizione ad ammalarsi minore dei controlli negativi (45% rispetto a 67%), la rielaborazione statistica non ha dimostrato la significatività dei risultati a causa del numero ridotto di controlli interni. L'indice di rischio relativo (RR) è risultato comunque pari a 0,70 dimostrando come il trattamento con PAW1 possa essere considerato fattore di protezione nei confronti delle nuove infezioni.

Nel corso della sperimentazione è stato possibile registrare nelle piante trattate con PAW1 una graduale e lieve riduzione dei sintomi da fitoplasmi ed un miglioramento del generale stato fisiologico che in molti casi ha permesso a piante fortemente stentate ad inizio stagione di arrivare a produzione. Fenomeni di remissione dei sintomi sono stati osservati in vite, in *Arabidopsis*, in vinca ed in crisantemo a seguito di trattamenti con BTH o auxina (Romanazzi *et al.*, 2013, Bressan *et al.*, 2005; Cùrkovic *et al.*, 2008; D'Amelio *et al.*, 2010). Questo comportamento, nel nostro caso, è stato registrato maggiormente in viti cv. Glera manifestanti principalmente sintomi settoriali rispetto a piante che già nel primo anno di studio esprimevano sintomi estesi a tutta la chioma e di grave entità; questo fenomeno avvale l'ipotesi che questa tipologia di applicazioni dovrebbe essere generalmente eseguita in modo preventivo allo scopo di mantenere elevate le difese inducibili delle piante limitando il proliferarsi della malattia. I risultati ottenuti con la verifica agronomica hanno confermato l'effetto positivo del trattamento PAW1 sia in termini di grappoli prodotti per pianta sia in termini di peso di 100 acini. Negli studi condotti da Romanazzi *et al.*, 2013 invece, a seguito di 13 applicazioni/anno con diversi induttori di resistenza quali Chitosan (Chito Plant; ChiPro GmbH, Germania), phosetyl-Al (Aliette; Bayer Crop Science, Germania), due formulazioni di glutatione (Kendal; Valagro, Italia e Olivis; Agrisystem, Italia) e benztiodiazolo (Bion; Syngenta Crop Protection, Svizzera) non è stata riscontrata alcuna differenza significativa con i controlli non trattati in termini di peso e diametro degli acini prodotti e quantità di uva per ceppo (Kg/vite). Questi risultati dimostrano l'assenza di una correlazione positiva tra induzione di resistenza e incremento della "fitness" della pianta

trattata confermando quanto fin'ora si è sempre pensato ossia che l'attivazione di vie metaboliche secondarie rappresentino un costo energetico per la pianta che deve dunque limitare crescita e sviluppo, condizioni molto frequenti in situazioni di stress.

Considerato tutto ciò appare chiaro come l'effetto di PAW1 risulti diverso da quello degli altri induttori di resistenza essendo in grado di implementare il risanamento delle piante ma nel contempo di migliorarne anche i parametri produttivi.

## CONCLUSIONE

---

La ricerca svolta parte dall'idea di utilizzare semplici composti presenti in natura (acqua, atmosfera e plasma), al fine di incrementare le difese delle piante contro agenti biotici ed abiotici. Nella pratica si tratta di utilizzare, in modo intelligente e ragionato, ciò che la natura costantemente produce: Plasma.

La tecnologia impiegata consente di ottenere una soluzione denominata acqua attivata al plasma (PAW), caratterizzata dalla presenza di forme reattive dell'ossigeno (RONs) e dell'azoto (RNS) in ambiente acido, composti sintetizzati generalmente dalla pianta in risposta a fenomeni di stress.

Allo scopo di ottenere il maggior numero di informazioni sull'effetto di questa soluzione in pianta sono state valutate le sue capacità di influenzare, da una parte l'espressione di geni coinvolti nei processi di resistenza indotta e, dall'altra, la regolazione post-trascrizionale operata dai miRNAs. Inoltre, con l'obiettivo di verificare l'applicabilità della metodologia studiata, l'utilizzo di PAW è stato sperimentato in vigneto nei confronti dei giallumi della vite.

Le analisi condotte a livello trascrizionale e post-trascrizionale hanno evidenziato la capacità di PAW di elicitare nelle piante l'espressione di geni coinvolti nella via biosintetica delle fitoalessine (alcaloidi in *C. roseus* - stilbeni in *V. vinifera*) e di modificare la regolazione post-trascrizionale di geni coinvolti in meccanismi di risposta a stress. Nella prova di campo questo si è tradotto in una riduzione del numero di viti colpite da giallume ed in un incremento dei loro parametri produttivi.

I risultati forniscono un quadro incoraggiante per l'utilizzo di questa soluzione in campo agrario considerando le capacità di PAW di stimolare le difese inducibili della pianta e nel contempo fornire benefici anche in termini fisiologico/produttivi.

Aspetto non meno interessante è rappresentato dal fatto che alcune delle vie metaboliche rinvenute sovra-espresse a seguito di esposizione a PAW, conducano alla sintesi di importanti composti anti-ossidanti impiegati in ambito farmaceutico. Esempio sono gli alcaloidi vincristina e vinblastina presenti in *C. roseus* utilizzati nel trattamento di linfomi e leucemia e lo stilbene resveratrolo presente in *V. vinifera* impiegato contro l'insorgenza di malattie cardiovascolari. PAW risulta quindi uno strumento utilizzabile sia nella gestione

delle malattie delle piante sia in una strategia che preveda l'elicitazione di importanti composti utilizzati in campo medico.

La prova di campo ha confermato i risultati ottenuti in laboratorio evidenziando, nelle piante infette trattate, una predisposizione maggiore al risanamento rispetto ai controlli.

La tecnica endoterapica, inoltre, è risultata un' efficiente metodologia applicativa, in grado di preservare le caratteristiche chimico-fisiche di PAW indispensabili per ottenere gli effetti osservati. Per l'utilizzo su larga scala di questa tecnologia è però indispensabile individuare una modalità di trattamento più consona alle esigenze pratiche atte a ridurre la tempistica ed i costi di applicazione. E' perciò possibile ipotizzare un suo utilizzo in ambito preventivo al fine di incrementare le difese inducibili delle piante. Tuttavia, al momento, la sua più probabile applicazione risulta essere in ambiente controllato (serra-vivaio), dove trattamenti frequenti con PAW potrebbero rappresentare un metodo innovativo ed ecosostenibile per favorire difesa e "fitness" delle colture.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Adenot X., Elmayan T., Lauressergues D., Boutet S., Bouche N., Gascioli V., Vaucheret H., 2006. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current Biology* 16, 927–932.
- Adrian M., Jeandet P., Veneau J., Weston L.A., Bessis R., 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23(7), 1689-1702.
- Adrian M., Daire X., Jeandet P., Breuil A.C., Weston L.A., Bessis R., Boundon E., 1997. Comparison of stilbene synthase activity (resveratrol amounts and stilbene synthase mRNAs levels) in grapevines treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(1), 60-64.
- Akiyama H., Sakai S., Sakugawa T., Namihira T., 2007. Environmental applications of repetitive pulsed power. *IEEE Transaction on Dielectrics Electrical Insulation* 14, 825–833.
- Albertazzi G., Milc J., Caffagni A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E., Pecchioni N., 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to “bois noir” phytoplasma infection. *Plant Science* 176, 792–804.
- Alma A., Davis R.E., Vibio M., Dainelli A., Bosco D., Arzone A., Bertaccini A., 1996. Mixed infection of grapevine in northern Italy by phytoplasmas including 16S Rna RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease* 80, 418-421.
- Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Arzone A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 115– 121.
- Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.-J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C., 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773–84.
- Alvarez-Garcia I., Miska E.A., 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132, 4653-4662.
- Ambros V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Ammar E-D., Hogenhout S.A., 2006. Mollicutes associated with arthropods and plants. In: *Insect Symbiosis*, Vol. 2 (Kostas B. e Miller T., eds), pp. 97–118. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- An Q., Ehlers K., Kogel K.-H., van Bel A.J.E., Hükelhoven R., 2006. Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist* 172, 563–576.
- Andreu A.B., Guevara M. G., Wolski E.A., Daleo G.R., Caldiz D.O., 2006. Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science* 62(2), 162-170.
- Angelini E., Squizzato, F., Lucchetta, G., Borgo, M., 2004. Detection of a phytoplasma associated with grapevine "flavescence dorée" in *Clematis vitalba* L.. *European Journal of Plant Pathology* 110, 193-201.
- Angelini E., Constable F., Duduk B., Fiore F., Quaglino F., Bertaccini A., 2018. Grapevine phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I. Characterization and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*. Ed. G.P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, L. Liefting. pagg. 123-151. Springer, Singapore.
- Apel K., Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
- Apostol I., Heinsteinst P.F., Low P.S., 1989. Rapid induction of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology* 90, 109–116.
- Atman D.G., 1991. *Practical statistics for medical research*. London, Chapman and Hall.

- Atman D.G., Deeks J.J., Sackett D.L., 1998. Odds ratios should be avoided when events are common. *BMJ* 317, 1318.
- Aukerman M.J., Sakai H., 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like “target” genes. *Plant Cell* 15, 2730–2741
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Jancso Radek A., Shevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout S., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188, 3682–3696.
- Bai X., Correa V.R., Toruño T.Y., Ammar E.-D., Kamoun S., Hogenhout S.A. 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that “target”s plant cell nuclei. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22, 18–30.
- Bailey T.L., Elkan C., 1995. The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. Proceedings. *International Conference on Intelligent System for Molecular Biology* 3, 21–29.
- Bais A.J., Murphy P.J., Dry I.B., 2000. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* 27(5), 425–433.
- Balakishiyeva G., Mammadov A., Foissac X., Huseynova I., Aliyev J., 2016. First Report of Grapevine 'Bois noir' in Azerbaijan. *Plant Disease* 100, 2522.
- Baggerly K.A., Deng L., Morris J.S., Aldaz C.M., 2003. Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. *Bioinformatics* 19(12), 1477–1483.
- Baker C.C., Sieber P., Wellmer F., Meyerowitz E.M., 2005. The *early extra petals1* mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15, 303–315.
- Battle A., Lavina A., Kuszala C., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E., 1997. Detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine in northern Spain. *Vitis* 36(4), 211–212.
- Beanland L., Hoy C.W., Miller S.A., Nault L.R., 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of Entomological Society of America* 93, 271–276.
- Belhadj A., Telef N., Saigne C., Cluzet S., Barrieu F., Hamdi S., Mérillon J.M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 493–499.
- Belli, G., Bianco P. A., Conti M., 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology* 92, 303–326.
- Bellomo C., Carraro L., Ermacora P., Pavan F., Osler R., Frausin C., Governatori G., 2007. Recovery phenomena in grapevine affected by grapevine yellows in Friuli Venezia Giulia. *Bullettin of Insectology* 60, 235–236.
- Benjamini Y., Hochberg Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57, 289.
- Berezikov E., Chung W.J., Willis J., Cuppen E., Lai E.C., 2007. Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell* 28, 328–336.
- Bertaccini A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673–689.
- Bertaccini A., 2014. <http://www.ipwgnnet.org/collection>.
- Bertaccini A., Duduk B., 2010. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 355–378.
- Bertaccini A., Davis R.E., Lee I-M., Conti M., Dally E.L., Douglas S.M., 1990. Detection of *Chrysanthemum* yellows mycoplasma like organism (MLO) by dot-hybridization and Southern blot analysis. *Plant Disease* 74, 40–43.
- Bertaccini A., Vibio M., Stefani E., 1995. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 34, 137–141.

- Bertaccini A., Borgo M., Bertotto L., Bonetti A., Botti S., Sartori S., Pondrelli M., Murari E., 2001. Termoterapia e chemioterapia per eliminare i fitoplasmi da materiali di moltiplicazione della vite. *L'informatore Agrario* 42, 137-144.
- Bertaccini A., Franova J., Botti S., Tabanelli D., 2005. Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciation in the Czech Republic. *FEMS Microbiology* 249, 79-85.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo N., 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5, 1763-1788.
- Bertamini M., Nedunchezian N., 2001. Effect of phytoplasma, “stolbur”-subgroup (“bois noir”-BN)] of photosynthetic pigments, saccarides, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field-grow grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* 39(1), 119-122.
- Bertamini M., Nedunchezian N., Tomasi F., Grando M.S., 2003. Phytoplasma [“stolbur”-subgroup (“bois noir”-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 357-366.
- Bézier A., Lambert B., Baillieul F., 2002. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 108(2), 11-120.
- Bi Y.M., Kenton P., Mur L., Darby R., Draper J., 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant Journal* 8, 235-245.
- Bianco P.A., Fortusini A., Scattini G., Casati P., Carraro S., Torresin G., 2000. Prove di risanamento di materiale viticolo affetto da flavescenza dorata mediante termoterapia. *Informatore Fitopatologico* 50, 43-49.
- Bianco P.A., Bulgari D., Casati P., Quaglino F., 2011. Conventional and novel strategies for the phytoplasma diseases containment. *Phytopathogenic Mollicutes* 1(2), 77-82.
- Binder B.Y., Peebles C.A., Shanks J.V., San K.Y., 2009. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Bio-technology Progress* 25, 8615.
- Bland M., 2015. Estimating mean and standard deviation from the sample size, three quartiles, minimum, and maximum. *International Journal of Statistics in Medical Research* 4, 57-64.
- Boerema G.H., de Gruyter J., Noordeloos M.E., Hamers M.E.C., 2004. Phoma identification manual. *Differentiation of Specific and Intra-pecific Taxa in Culture*. CABI Publishing, 470.
- Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P., 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139, 652-663.
- Bondarciuc V., Filippin L., Haustov E., Forte V., Angelini E., 2018. Survey on grapevine yellows and their vectors in the Republic of Moldova. *19<sup>th</sup> Congress of the international council for the study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine (ICVG)*, Santiago, Chile, 150.
- Borgo M., Murari E., Sartori S., Zanzotto A., Sancassani P., Bertaccini A., 1999. Termoterapia per eliminare i fitoplasmi da vite. *Informatore Agrario* 55(24), 47-51.
- Borgo M., Albanese G., Quaglino F., Casati P., Ermacora P., Ferretti L., Ferrini F., Filippin L., Pasquini G., Angelini E., 2008. Ruolo di altre piante nell'epidemiologia dei fitoplasmi agenti di flavescenza dorata e legno nero. *Petria* 18, 261-263.
- Borgo M., Filippin L., Bertazzon N., Angelini E., 2009. Detection of phytoplasmas associated with grapevine yellows in rootstocks. *Le Progrès Agricole at viticole HS*, 162-163.
- Bourbonnais R., Paice M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letture* 267(1), 99-102.
- Botti S., Bertaccini A., 2006. First report of phytoplasmas in grapevine in South Africa. *Plant Disease* 90, 1360.

- Bressan A., Purcell A.H., 2005. Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental host plant. *Plant Diseases* 89, 1121-1124.
- Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O., 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185–1190.
- Brown D.R., May M., Bradbury J.M., Johansson K-E., 2010. Class I. Mollicutes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Volume 4, pp. 568–573. Eds N.R. Krieg, W. Ludwig, W.B. Whitman, B.P. Hedlund, B.J. Paster, J.T. Staley, N. Ward, D. Brown and A. Parte. New York, NY, USA: Springer.
- Bruggeman P., Leys C., 2009. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. *Journal of Physics D: Applied Physics* 42(5), 053001.
- Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., Bianco P.A., 2011. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Applied Environmental Microbiology* 77, 5018–5022.
- Bulgari D., Bozkurt A.I., Casati P., Caglayan K., Quaglino F., Bianco P.A., 2012. Endophytic bacterial community living in roots of healthy and '*Candidatus* Phytoplasma mali'-infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 677-687.
- Cai Z., Kastell A., Speiser C., Smetanska I., 2013. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171, 330–340.
- Calari A., Paltrinieri S., Contaldo N., Sakalieva D., Mori N., Duduk B., Bertaccini A., 2011. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. *Bulletin of Insectology* 64(Supplement): S157-S158.
- Campbell M.J., 1995. How to present numerical result. Reece D, ed. How to do it. London, BMJ Publishing group.
- Canik D., Ertunc F., Paltrinieri S., Contaldo N., Bertaccini A., 2011. Identification of different phytoplasma infecting grapevine in Turkey. *Bulletin of Insectology* 64, 225-226.
- Canto-Canche B.B., Loyola-Vargas V.M., 2001. Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases in the Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. In vitro *Cellular and Developmental Biology Plant* 37, 622-628.
- Carginale V., Maria G., Capasso C., Ionata E., La Cara F., Pastore M., Bertaccini A., Capasso A., 2004. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene* 332, 29–34.
- Carneiro N., Souto A.P., Silva E., Marimba A., Tena B., Ferreira H., Magalhaes V., 2001. Dyeability of corona-treated fabrics. *Coloration Technology* 117, 298.
- Carthew R.W., Sontheimer E.J., 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4), 642-55.
- Carvalho R., Carvalho A., Silva M., Demarquette N., Assis O., 2005. Use of thin films obtained by plasma polymerization for grain protection and germination enhancement. *Quimica Nova* 28(6), 1006-1009.
- Casati P., Jermini M., Quaglino F., Corbani G., Schaerer S., Passera A., Bianco P. A., 2017. New insights on “flavescence dorée” phytoplasma ecology in the vineyard agro-ecosystem in southern Switzerland. *Annals of Applied Biology* 171, 37-51.
- Catlin P.B., Olsson E.A., Beutel J.A., 1975. Reduced translocation of carbon and nitrogen from leaves with symptoms of pear curl. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100, 184–187.
- Caudwell A., 1961. Les phénomènes de rétablissement chez la flavescence dorée de la vigne. *Annals of Epiphytes* 12, 347-354.

- Caudwell A., 1990. Epidemiology and characterization of “flavescence dorée” (FD) and other grapevine yellows. *Agronomie* 10, 655–663.
- Chalak L., Elibitar A., Rizk R., Choueiri E., Salar P., Bové J., 2005. Attempts to eliminate 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy. *Journal of Plant Pathology* 112, 85–89.
- Chandra S., Martin G.B., Low P.S., 1996. The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13393–13397.
- Chen F., 2006. *Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion*, Plenum Press New York and London.
- Chen X., 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303, 2022–2025.
- Chen X., 2009. Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25, 21–44.
- Chen W-Y., Lin C-P., 2011. Characterization of *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by peanut witches' broom phytoplasma infection. *Journal of Phytopathology* 159, 505–510.
- Chen Z., Silva H., Klessig D.F., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 262(5141), 1883–1885.
- Chodiseti B., Rao K., Gandhi S., Giri A., 2013. Improved gymnemic acid production in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* through biotic elicitation. *Plant Biotechnology Reports* 7, 519–525.
- Chong J., Poutaraud A., Huguency P., 2009. Metabolism and roles of stilbene in plants. *Plant Science* 177, 143–155.
- Chou W.M., Kutchan T.M., 1998. Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. *The Plant Journal* 15(3), 289–300.
- Choueiri E., Jreijiri F., El Zammari S., Verdin E., Salar P., Danet J-L., Bové J., Garnier M., 2002. First report of grapevine “bois noir” disease and a new phytoplasma infecting solanaceous plants in Lebanon. *Plant Disease* 86(6), 697–697.
- Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M., Schultz A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17, 1175–1184.
- Chuck G., Meeley R. B., Irish E., Sakai H., Hake S., 2007. The maize tassel seed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by “target”ing Tassel seed6/indeterminate spikelet1. *Nature Genetics* 39, 1517–1521.
- Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X., 2009. Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the “stolbur” phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2951–2957.
- Clouse S.D., 2011. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23, 1219–1230.
- Collinge D.B., Susarenka A.J., 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9, 389–410.
- Collins N.C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu, J. L., Huckelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S., Schulze-Lefert P., 2003. SNARE-protein mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425, 973–977.
- Conesa A., Götz S., García-Goméz J.M., Terol J., Talón M., Robles M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18), 3674–3676.
- Constable F. E., 2010. Phytoplasma epidemiology: grapevines as a model. In: Weintraub P, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, pp 188–212.

- Contaldo N., Soufi Z., Bertaccini A. 2011. Preliminary identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Syria. *Bulletin of Insectology* 64(Supplement), S217-S218.
- Contaldo N., Bertaccini A., Paltrinieri S., Windsor H.M., 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 607-617.
- Contaldo N., Satta E., Zambon Y., Paltrinieri S., Bertaccini A., 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods* 127, 105-110.
- Cruickshank I.A.M., 1963. Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology* 1, 351-374.
- Culver J.N., Dawson W.O., 1991. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 4, 458-463.
- Čurković Perica M., Lepedus H., Music M.S., 2007. Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas infected *Catharanthus roseus* shoots grown *in vitro*. *FEMS Microbiological Letters* 268, 171-177.
- Čurković Perica M., 2008. Auxin-treatment induces recovery of phytoplasma-infected periwinkle. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1826-1834.
- Custers J.H.H.V., Harrison S.J., Sela-Buurlage M.B., van Deventer E., Lageweg W., Howe P.W., van der Meijs P.J., Ponstein A.S., Simons B.H., Melchers L.S., Stuijver M.H., 2004. Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant Journal* 39, 147-160.
- Czotter N., Molnár J., Pesti R., Demián E., Baráth D., Varga T., Várallyay É., 2018. Use of siRNAs for diagnosis of viruses associated to woody plants in nurseries and stock collections. *Methods in Molecular Biology* 1746, 115-130.
- D'Amelio R., Marzachi C., Bosco D., 2010. Activity of benzothiadiazole on chrysanthemum yellows phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma asteris*) infection in daisy plant. *Crop Protection* 29, 1094-1099.
- Dai Q., He F., Liu P., 1997. Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. *Plant Pathology* 46, 56-61.
- Dai X., Zhao P.X., 2011. psRNA"target": a plant small RNA "target" analysis server. *Nucleic Acid Research* 39(2), 155-159.
- Danielli A., Bertaccini A., Bosco D., Alma A., Vibio M., Arzone A., 1996. May evidence of 16SrI-group-related phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball suggest their transovarial transmission? *IOM letters* 4, 190-191.
- Dat J.F., Pellinen R., Beeckman T., van de Cotte B., Langebartels C., Kangasjärvi J., Inzé D., van Breusegem F., 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal* 33, 621-632.
- Davis D., Clark M., 1994. Maintenance of mycoplasma-like organism occurring in *Pyrus* species by micropropagation and their elimination by tetracycline therapy. *Plant Pathology* 43, 819-823.
- Davis R.E., Dally E.L., Tanne E., Rumbos I.C., 1997. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the "stolbur" phytoplasma subgroup, 16SrXII-A. *Journal of Plant Pathology* 79, 181-187.
- Davis R.E., Dally E.L., Gundersen D.E., Lee I.M., Habili N., 1997b. '*Candidatus Phytoplasma australiense*', a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevines yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 26-29.
- Davis R.E., Jomantiene R., Dally E.L., Wolf T.K., 1998. Phytoplasma associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup) and group 16SrIII, new subgroup I. *Vitis* 37, 131-137.
- De Luca V., St-Pierre B., 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 5(4), 168-173.
- De Luca V., Balsevich L., Tyler P.T., Eilert U., Panchuk B.D., Kurz W.G.W., 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology* 125, 147-156.

- Denancé N., Sánchez-Vallet A., Goffner D., Molina A., 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormone sinbalancing immuneresponses and fitness costs. *Frontiers in Plant Sciences* 4, 155.
- Dermastia M., Bertaccini A., Constable F., Mehle N., 2017. Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents - Biology and detection. Springer briefs in agriculture, Springer International Publishing AG, Switzerland, 99 pp.
- Desikan R., Neill S.J., Hancock J.T., 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine* 28(5), 773-778.
- Dickinson M., Tuffen M., Hodgetts J., 2013. The phytoplasmas: an introduction. In: Phytoplasmas: methods and protocols. Dickinson M. e Hodgetts J., (Eds.), 938, 1-14.
- Dinelli G., Rea M., 1990. Pulse power electrostatic technologies for the control of flue gas emissions. *Journal of Electrostatics* 25, 23.
- Ding Y., Wu W., Wei W., Davis R.E., Lee I-M., Hammond R.W., Sheng J.P., Shen L., Jiang Y., Zhao Y., 2013. Potato purple top phytoplasma-induced disruption of gibberellin homeostasis in tomato plants. *Annals of Applied Biology* 162, 131–139.
- Divi U.K., Krishna P., 2009. Brassinosteroid: a biotechnological “target” for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology* 26, 131–136.
- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.K.S., Wang L., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371–390.
- Dixon R.A., Harrison M.J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32, 479-501.
- Dixon R.A., Palva N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-97.
- Doi Y., Yora K., Teranaka M., Asuyama H., 1967. Mycoplasma or PLT group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33, 259–266.
- Dong-Wen L., Zhen S., Zhu G.R., Bian Y.W., Chen G.X., Han C.X., Yu Z.T., Yan Y.M., 2016. High-throughput sequencing reveals H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-associated microRNAs and a potential regulatory network in *Brachypodium distachyon* seedlings. *Frontieres of Plant Sciences* 7, 1567.
- Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H., 1999. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 1068–1077.
- Duduk B., Ivanovic M., Dukic N., Botti S., Bertaccini A., 2003. First report of an elm yellows subgroup 16SrV-C phytoplasma infecting grapevine in Serbia. *Plant Disease* 87(5), 599.
- Duduk B., Tian J.B., Contaldo N., Fan X.P., Paltrinieri S., Chen Q.F., Zhao Q.F., Bertaccini A., 2010. Occurrence of phytoplasmas related to “stolbur” and to ‘*Candidatus Phytoplasma japonicum*’ in woody host plants in China. *Journal of Phytopathology* 158, 100-104.
- Durbin M.L., McCaig B., Clegg M.T., 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Molecular Biology* 42, 79-92.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig, D. F., 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10328-10333.
- Eamens A.L., Kim K.W., Curtin S.J., Waterhouse P.M., 2012. DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7, e35933.
- Ebel J., Cosio E.G., 1994. Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology* 148, 1-36.
- Ehya F., Monovarfeshani A., Fard E. M., Farsad L. K., Nekouei M. K., Mardi M., Salekdeh G. H., 2013. Phytoplasma-responsive microRNAs modulate hormonal, Nutritional, and stress signalling pathways in Mexican lime trees. *PLoS ONE* 8(6): e66372.
- Eldem V., Okay S., Unver T., 2013. Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37, 1-21.

- Ellinger D., Voigt C.A., 2014. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany* 114, 1349-1358.
- Emery J.F, Floyd S.K, Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Izhaki A., Baum S.F., Bowman J.L., 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and *KANADI* genes. *Current Biology* 13, 1768–1774.
- Engelbrecht M., Joubert J., Burger J.T., 2010. First report of aster yellows phytoplasma in grapevines in South Africa. *Plant Pathology* 94(3), 373.
- Engels W. R. 1993. Contributing software to the internet: the Amplify program. *Trends in Biochemistry Science* 18, 448–450.
- Eviatar-Ribak T., Shalit-Kaneh A., Chappell-Maor L., Amsellem Z., Eshed Y., Lifschitz E., 2013. A cytokinin-activating enzyme promotes tuber formation in tomato. *Current Biology* 23(12), 1057–64.
- Fabiani D., Zaccaria M., Focarete M.L., Gualandi C., Colombo V., Ghedini E., Gherardi M., Laurita R., Sanibondi P., 2013. Plasma assisted nanoparticle dispersion in polymeric solutions for the production of electrospun lithium battery separators. *IEEE International Conference Solid Dielectrics* 7, 18–21.
- Fabre A., Danet J-L., Foissac X., 2011. The “stolbur” phytoplasma antigenic membrane protein gene STAMP is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472, 37-41.
- Fan G., Cao X., Niu S., Deng M., Zhao Z., Dong Y., 2015. Transcriptome, microRNA, and degradome analyses of the gene expression of *Paulownia* with phytoplasma. *BMC Genomics* 16, 896.
- Fan G., Niu S., Xu T., Deng M., Zhao Z., Wang Y., Cao L., Wang Z., 2015. Plant-pathogen interaction-related microRNAs and their “target”’s provide indicators of phytoplasma infection in *Paulownia tomentosa* x *Paulownia fortunei*. *PLoS ONE* 10(10), e0140590.
- Farztdinov V., McDyer F., 2012. Distributional fold change test- a statistical approach for detecting differential expression in microarray experiments. *Algorithms for Molecular Biology* 7(1), 29.
- Farr S.B., Kogoma T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Review* 55, 561-585.
- Ferdous J., Hussain S.S., Shi B.J., 2015. Role of microRNAs in plant drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 13, 293-305.
- Fidelibus M.W., Christensen L.P., Katayama D.G., Verdenal P.T., 2006. Yield components and fruit composition of six Cabernet Sauvignon grapevine selections in the central San Joaquin valley, California. *Journal of the American Pomological Society* 60(1), 32-36.
- Figueiredo A., Fortes A.M., Ferreira S., Sebastiana M., Choi Y.H., Sousa L., Acioli-Santos B., Pessoa F., Verpoorte R., Pais M.S., 2008. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany* 12, 3371-3381.
- Filippin L., Angelini E., Lucchetta G., Leandrin, L., Borgo M., 2005. Presenza di fitoplasmi nella flora spontanea dei vigneti. *Petria* 15(1/2), 77-79.
- Filippin L., Jovic J., Cvrkovic T., Forte, V. Clair D., Tosevski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini E., 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with “flavescence dorée” in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* 58(5), 826-837.
- Fisher R.A., 1925. Applications of Student’s distribution. *Metron* 5, 90-104.
- Fletcher J., Wayadande A., Melcher U., 1998. The phytopathogenic mollicute insect vector interface: a closer look. *Phytopathology* 88, 1351–58.
- Foissac X., Jreijiri F., Salar P., Wakim S., Danet J-L., Choueiri E., 2018. A ‘*Candidatus* Phytoplasma omanense’-related strain detected in yellowing grapevine, stunted bindweed and Cixiidae planthoppers in Lebanon. *European Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1525-5>.
- Frémont L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* 66, 663-673.

- Fritzeimer K.H., Rolfs C.H., Pfau J., Kindl H., 1983. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta* 159, 25-29.
- Fukudome A., Fukuhara T., 2017. Plant dicer-like proteins: double-stranded RNAcleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research* 130, 33–44.
- Fung R.W., Gonzalo M., Fekete C., Kovacs L.G., He Y., Marsh E., McIntyre L.M., Schachtman D.P., Qiu W., 2008. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology* 146, 236-249.
- Gaffuri F., Sacchi S., Cavagna B., 2011. First detection of the mosaic leafhopper, *Orientalis ishidae*, in northern Italy infected by the “flavescence dorée” phytoplasma. *New Disease Report* 24, 22.
- Gai Y.P., Li Y.Q., Guo F.Y., Yuan C.Z., Mo Y.Y., Zhang H.L., Wang H., Ji X.L., 2014. Analysis of phytoplasma -responsive sRNAs provide insight into the pathogenic mechanisms of mulberry yellow dwarf disease. *Scientific Reports* 4:5378.
- Galetto L., Miliordos D., Roggia C., Rashidi M., Sacco D., Marzachi C., Bosco D., 2014. *Journal of Pest Science* 87, 671-679.
- Ganapathi G., Kargi F., 1900. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (periwinkle). *Journal of Experimental Botany* 41, 259–267.
- Garau R., Sechi S., Prota V.A., Moro G., 2007. Productive parameters in Chardonnay and Vermentino grapevines infected with "bois noir" and recovered in Sardinia. *Bulletin of Insectology* 60, 233-234.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Plant-Microbe interactions* 19(7), 711-724.
- Gascioli V., Mallory A.C., Bartel D.P., Vaucheret H., 2005. Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology* 15, 1494–1500.
- Ghildiyal M., Zamore P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews Genetics* 10, 94-108.
- Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D., 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85, 169-74.
- Gill S.S., Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930.
- Gajardo A., Fiore N., Prodan S., Paltrinieri S., Botti S., Pino A.M., Zamorano A., Montealegre J., Bertaccini A., 2009. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Chile. *Plant Disease* 93, 789-796.
- Glazebrook J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205–227.
- Goldston, R. J., Rutherford, P. H., 1995. Introduction to plasma physics. Taylor & Francis Group, 493.
- Govrin E.M., Levine A., 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751–757.
- Graham T.L., 1998. Flavonoid and flavol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36, 135-144.
- Grayer R. J., Kokubun T., 2000. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56, 253-263.
- Green S., Luo C., Lee D., 1989. Elimination of mycoplasma-like organisms from witches' broom infected sweet potato. *Journal of Phytopathology* 126, 204-212.
- Greenberg J.T., Yao N., 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6, 201–211.
- Grigg S.P., Canales C., Hay A., Tsiantis M., 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature* 437, 1022–1026.

- Guce 1990. Metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* no. 2676/90, 17 Settembre 1990, L272, 3 Ottobre 1990.
- Guerriero G., Giorno F., Ciccotti A.M., Schimdt S., Baric S., 2012. A gene expression analysis of cell wall biosynthetic genes in *Malus × domestica* infected by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *Tree Physiology* 32, 1365–1377.
- Guest D.I., 1984. Modification of defense responses in tobacco and capsicum following treatment with Fosetyl-Al [Aluminium tris (o-ethyl phisphonate)]. *Physiological Plant Pathology* 25(2), 125-134.
- Guirimand G., Courdavault V., Lanoue A., Mahroug S., Guihur A., Blanc N., Giglioli-Guivarch N., St-Pierre B., Burlat V., 2010. Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a “nuclear time bomb”? *BMC Plant Biology* 10.
- Gundersen D.E., Lee I-M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35, 144-151.
- Guo H.S., Xie Q., Fei J.F., Chua N.H., 2005. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell* 17(5), 1376–1386.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T., 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16(3), 160-168.
- Guy C., Miles J., 1974. Irving Langmuir: a biographical memoirs. National Academy of Sciences. Washington D.C. USA.
- Hahn M.G., 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual review of Phytopathology* 34, 387-412.
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., 2000. Response to plant pathogens. In: Buchnan B., Gruissen W., Jones R., (ed) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, USA, 1102-1156.
- Hanboonsong Y., Choosai C., Panyim S., Damak S., 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11, 97–103.
- Harborne J.B., 1998. *The flavonoids: advances in research since 1980*. New York: Chapman and Hall.
- Hasan M., Bae H., 2017. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules* 22(2), 294.
- Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany* 68, 14–25.
- Heaselgrave W., Andrew P.W., Kilvington S., 2010. Acidified nitrite enhances hydrogen peroxide disinfection of *Acanthamoeba*, bacteria and fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1207–1214.
- Heitefuss, R., 1997. Cell wall modification in relation to resistance. In H. Hartleb, R. Heitefuss, & H.-H. Hoppe (Eds.), *Resistance of Crop Plants Against Fungi* 100–125.
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S., 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14(3), 125-132.
- Herrmann K.M., 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7, 907-919.
- Himeno M., Neriya Y., Minato N., Miura C., Sugawara K., Ishii Y., Yamaji Y., Kakizawa S., Oshima K., Namba S., 2011. Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *The Plant Journal* 67, 971–979.
- Hirt, H. 1997. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* 2, 11–15.
- Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M., 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate

- species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1826–1837.
- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E-D, Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba S., 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9, 403-423.
- Hogenhout S.A., Loria R., 2008b. Virulence mechanisms of gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 449-56.
- Hogenhout S.A., Vander Hoorn R.A., Terauchi R., Kamoun S., 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organism. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22, 115-22.
- Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S., 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6416–6421.
- Hren M., Ravnikar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P.A., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter A., Gruden K., 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology* 58, 170–180.
- Hückelhoven R., Kogel K.-H., 2003. Reactive oxygen intermediates in plant microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891–902.
- Hung S.H., Yu C.W., Lin C.H., 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei* 46(1), 1-10.
- Hur Y.S., Um J.H., Kim S., Kim K., Park H.J., Lim J.S., Kim W.Y., Jun S.E., Yoon E.K., Lim J., Ohme-Takagi M., Kim D., Park J., Kim G.T., Cheon C.I., 2015. *Arabidopsis thaliana* homeobox 12 (ATHB12), a homeodomain-leucine zipper protein, regulates leaf growth by promoting cell expansion and endoreduplication. *The New Phytologist* 205(1), 316–28.
- Hutcheson S.W., 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36, 59-90.
- Hutvagner G., Zamore P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056–2060.
- Iasur-Kruh L., Zahavi T., Barkai R., Freilich S., Zchori-Fein E., Naor V., 2018. *Dyella*-like bacterium isolated from an insect as a potential biocontrol agent against grapevine yellows. *Phytopathology* 108(3), 336-341.
- Ibrahim F., Rohr J., Jeong W.J., Hesson J., Cerutti H., 2006. Untemplated oligoadenylation promotes degradation of RISC-cleaved transcripts. *Science* 314, 1893.
- Idrees M., Naeem M., Aftab T., Khan M.M., 2010. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiologia Plantarum* 33, 987–999.
- Ikawa S., Kitano K., Hamaguchi S., 2010. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. *Plasma Processes and Polymers* 7, 33–42.
- Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T., Ishikawa M., 2010. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular Cell* 39, 282–291.
- Imlau A., Truernit E., Sauer N., 1999. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 11, 309-22.
- Irmia N., Ulea E., Balau A.M., 2010. Detection of pathogen Flavescence dorée phytoplasma in some grapevine varieties using ELISA test. *Seria Agronomie* 53, 187-190.
- IRPCM, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4), 1243–1255.

- Jagoueix-Eveillard S., Tarendau F., Guolter K., Danet J-L., Bové J-M., Garnier M., 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 225-233.
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M., 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2731-2741.
- Jermine M., Gusberti M., Schaub L., Linder C., Gugerli P., Schärer S., Kehrli P., Colombi L., Bellion S., Emery S., 2008. “Flavescence dorée” and *Scaphoideus titanus*: distribution and control in Switzerland. *IOBC/WPRS Bulletin* 36, 107-111.
- Jezic M., Karoglan Kontic J., Preiner D., Maletic E., Curkovic-Perica M., 2013. Grapevine yellows affecting the Croatia indigenous grapevine cultivar Grk. *Acta Botanica Croatia* 72(2), 287-294.
- Jiang J., He X., Li L., Li J., Shao H., Xu Q., Ye R., Dong Y., 2014a. Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. *Plasma Science and Technology* 16(1), 54-58.
- Jiang J., Lu Y., Li J., Li L., He X., Shao H., Dong, Y., 2014b. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt). *PloS ONE* 9(5), 1-6.
- Jomantiene R., Davis R.E., 2006. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiology Letters* 255, 59-65.
- Jomantiene R., Zhao Y., Davis R.E., 2007. Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA Cell Biology* 26, 557-564.
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 19-53.
- Joshi S.G., Yost A., Joshi S.S., Addya S., Ehrlich G., Brooks A., 2015. Microarray analysis of transcriptomic response of *Escherichia coli* to nonthermal plasma-treated PBS solution. *Advances in Bioscience Biotechnology* 6, 49–62.
- Kachroo A., He Z., Patkar R., Zhu Q., Zhong J., Li D., Chattoo B. B., 2003. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Research* 12(5), 577-586.
- Kakizawa S., Oshima K., Kuboyama T., Nishigawa H., Jung H-Y., Sawayanagi T., Tsuchizaki T., Miyata S., Ugaki M., Namba S., 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14, 1043–1050.
- Kakizawa S., Oshima K., Nishigawa H., Jung H-Y., Wei W., Suzuki S., Tanaka M., Miyata S-I., Ugaki M., Namba S., 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 135–142.
- Kaltenbach M., Schröder G., Schmelzer E., Lutz V., Schöder J., 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *The Plant Journal* 19(2), 183-193.
- Kamgang-Youbi G., Herry J.M., Bellon-Fontaine M.N., Brisset J.L., Doubla A., Naïtali M., 2007. Evidence of temporal postdischarge decontamination of bacteria by gliding electric discharges: application to *Hafnia alvei*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4791–4796.
- Kamgang-Youbi G., Herry J.M., Brisset J.L., Bellon-Fontaine M.N., Doubla A., Naïtali M., 2008. Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/ detached state: case of *Hafnia alvei* inactivation by plasma activated water. *Applied and Microbiology and Biotechnology* 81, 449–457.
- Karimi M., Contaldo N., Mahmoudi B., Duduk B., Bertaccini A., 2009. Identification of stolbur related phytoplasmas in grapevine showing decline symptoms in Iran. *Le Progrès agricole et viticole* HS: 208-209.
- Karrer S., 2010. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 8, 968–976.

- Kawakita H., Saiki T., Wei W., Mitsuhashi W., Watanabe K., Sato M., 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90, 909–14.
- Khan A.J., Botti S., Paltrinieri S., Al-Subhi A.M., Bertaccini A., 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? 14<sup>th</sup> International Congress of the IOM, Vienna, July 07-12, 6.
- Khraiwesh B., Zhu J.K., Zhu J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica and Biophysica Acta* 1819(2), 137-48.
- Kim H. H., 2004. Nonthermal plasma processing for air-pollution control: a historical review, current issues, and future prospects. *Plasma Processes and Polymers* 1, 91.
- Kim J.H., Woo H.R., Kim J., Lim P.O., Lee I.C., Choi S.H., Hwang D., Nam H.G., 2009. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* 323, 1053–1057.
- King R.E., Bomser J.A., Min D.B., 2006. Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Food Science and Food Safety* 5, 65-70.
- Kloosterman W.P., Plasterk R.H., 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental Cell* 11, 441-450.
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F., 2005. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126(2), 485-493.
- Kriston E., Krizbai L., Szabo G., Bujdosó B., Orosz S., Dancshazy Z., Szonyegi S., Melika G., 2013. First occurrence of grapevine flavesence dorée in Hungary. *Novenyvedelem* 49, 433-438.
- Krzyzanowska J., Czubacka A., Pecio L., Przybys M., Doroszevska T., Stochmal A., Oleszek W., 2012. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108, 73–81.
- Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E., 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal* 185942, 1-25.
- Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A.M., Reinhardt R., Seemüller E., 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics* 9, 306.
- Kunze L., 1976. The effect of different strains of apple proliferation on the growth and crop of infected trees. *Mitteilungen biologische bundesamt land-forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 170, 107-115.
- Kuske C.R., Kirkpatrick B.C., Davis M.J., Seemüller E., 1991. DNA hybridization between western aster yellows mycoplasma-like organism plasmid and extrachromosomal DNA from other plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 75-80.
- Laimer M., Lemaire O., Herrbach E., Goldschmidt V., Minafra A., Bianco P.A., Wetzel T., 2009. Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: a review. *Journal of Plant Pathology* 91, 7-23.
- Lam E. 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 5, 305–315.
- Lam E., Kato N., Lawton M., 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848–853.
- Lamb C., Dixon R.A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251–275.
- Landi L., Romanazzi G., 2011. Seasonal variation of defence-related gene expression in leaves from Bois noir affected and recovered grapevines. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59, 6628-6637.
- Langeke P., Pryce R.J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* 9(1), 77-86.
- Langeke P., McCarthy W.V., 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18, 244-253.

- Lattanzio V., Lattanzio V.M., Cardinali A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry Advances in Research* 661, 23–67.
- Laurita R., Gherardi M., Colombo V., Lukes P., 2015. Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. *Plasma-Liquid Interactions* 3(2), 53-61.
- Lee I-M., Davis R.E., 1988. Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organism by using cloned DNA and RNA probes. *Plant-Microbe Interactions* 1, 303-310.
- Lee I-M, Davis R.E., Chen T-A., Chiykowski L.N., Fletcher J., Hiruki C., Scaff D.A., 1992. A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organism (MLOs) in the aster yellow MLO strain cluster. *Phytopathology* 82, 977-986.
- Lee I-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998a. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153–1169.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A., 1998b. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88(12), 1359-1366.
- Lee I-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual review of Microbiology* 54, 221-255.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C., Seemüller E., 2004. ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1037-1048.
- Lee I-M., Zhao Y., Davis R.E., Wei W., Martini M., 2007. Prospects of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 60 (2), 239.
- Lee I.-M., Bottner-Parker K.D., Zhao Y., Davis R.E., Harrison N.A., 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2887–2897.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843–854.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Legendre L., Heinsteins P.F., Low P.S., 1992. Evidence for the participation of GTP-binding proteins in the elicitation of rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *Journal of Biological Chemistry* 267, 20140–20147.
- Legendre L., Rueter S., Heinsteins P.S., Low, P.S., 1993. Characterisation of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiology* 102, 233–240.
- Leon J., Yalpani N., Raskin I., Lawton M.A., 1993. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* 103(2), 323-328.
- Leonard K.J., Bushnell W.R., 2004. Fusarium head blight of wheat and barley. APS Press, USA.
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemüller E., 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 59–68.
- Lessio F., Tedeschi R., Alma A. 2007. Population dynamics, host plants and infection rate with “stolbur” phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in north-western Italy. *Journal of Plant Pathology* 89, 97-102.
- Lessio F., Picciau L., Gonella E., Mandrioli M., Tota F., Alma A., 2016. The mosaic leafhopper *Orientalus ishidae*: host plants, spatial distribution, infectivity, and transmission of 16SrV phytoplasma to grapevines. *Bulletin of Insectology* 69(2), 277-289.

- Leung A.K., Sharp P.A., 2010. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular Cell* 40(2), 205-215.
- Levine A., 1999. Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. In: Plant responses to environmental stresses. From phytohormones to genome reorganization. Ed. H.R. Lerner. The Hebrew University of Jerusalem Givat Ram, Jerusalem, Israel, pp. 247-264.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C., 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Li J., Zhang Z.G., Ji R., Wang Y.C., Zheng X.B., 2006. Hydrogen peroxide regulates elicitor PB90-induced cell death and defense in non-heading Chinese cabbage. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67, 220-230.
- Li S., Liu L., Zhuang X., Yu Y., Liu X., Cui X., Ji L., Pan Z., Cao X., Mo B., Zhang F., Raiknel N., Jiang L., Chen X., 2013. MicroRNAs inhibit the translation of “target” mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* 153, 562-574.
- Li W., Oono Y., Zhu J., He X., Wu J., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., Zhu J.K., 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20(8), 2238-2251.
- Li Y., 2016. Redox regulation of salicylic acid synthesis in plant immunity. Doctoral dissertation, University of Edinburgh, 97.
- Li Y., Zhang Q., Zhang J., Wu I., Qi Y., Zhou J.M., 2010. Identification of microRNA is involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology* 152, 2222-2231.
- Lieberman M.A., Lichtenberg A.J., 2005. Principles of plasma discharges and materials processing. John Wiley & Sons, 756.
- Liefting L.W., Andersen M.T., Beever R.E., Gardner R.C., Forster R.L.S., 1996. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNAs genes of *Phormium* yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9), 3133-3139.
- Liefting L.W., Shaw M.E., Kirkpatrick B.C., 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Microbiology* 150(6), 1809-1817.
- Lin J.K., Tsai S.H., 1999. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proceeding of the National Science Council, Republic of China* 23(3), 99-106.
- Liu C., Xu G., Wang T., 1999. Non-thermal plasma approaches in CO<sub>2</sub> utilization. *Fuel Process* 58, 119-134.
- Liu L., Du H., Tang X.F., Wu Y.M., Huang Y.B., et al. 2008. The roles of MYB transcription factors on plant defense responses and its molecular mechanism. *Hereditas* 30, 1265-1271.
- Liu J., Gao F., Ren J., Lu X., Ren G., Wang R., 2017. A novel AP2/ERF Transcription factor CR1 regulates the accumulation of vindoline and serpentine in *Catharanthus roseus*. *Frontiers in Plant Science* 8, 2082.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K.D., Carrington J.C., 2002. Cleavage of scarecrow-like mRNA “target” directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297, 2053-2056.
- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens E., Seemüller E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Luijendijk T.J.C., van der Meijden E., Verpoorte R., 1996. Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. *Journal of Chemical Ecology* 22, 1355-1366.
- Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Lungtenberg B., Kamilova F., 2009. Plant-growth- promoting *Rhizobacteria*. *Annals Review of Microbiology* 63, 541-546.
- Lusso M., Kuc J., 1999. Plant responses to pathogens. In: Lerner H (ed) Plant responses to environmental stresses from phytohormones to genome reorganization, pp. 683-706.

- Livak J., Schmittgen D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta CT)$ . *Methods* 25, 402-408.
- MacLean A.M., Sugio A., Makarova O.V., Findlay K.C., Grieve V.M., Tóth R., Nicolaisen M., Hogenhout S.A., 2011. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiology* 157, 831–841.
- MacLean A.M., Orlovskis A., Kowitzwanich K., Zdziarska A.M., Angenent G.C., Immink R.G.H., Hogenhout S.A., 2014. Phytoplasma effectors SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biology* 12, e1001835.
- Magureanu M., Piroi D., Mandache N.B., David V., Medvedovici A., Bradu C., Parvulescu V.I., 2011. Degradation of antibiotics in water by non-thermal plasma treatment. *Water Research* 45, 3407–3416.
- Maixner M., Ahrens U., Seemüller E., 1995. Detection of the German grapevine yellows (“Vergilbungskrankheit”) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* 101, 241–250.
- Maixner M., Reinert W., Darimont H., 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* 39(2), 83-84.
- Malolepsza U., 2005. Spatial and temporal variation of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hydroxyethylrutin-treated tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 54, 317–324.
- Marco F.D., Pagliari L., Degola F., Buxa S.V., Loschi A., Dinant S., Hir R.L., Morin H., Santi S., Musetti R., 2016. Combined microscopy and molecular analyses show phloem occlusions and cell wall modifications in tomato leaves in response to 'Candidatus Phytoplasma solani'. *Journal of Microscopy* 263(2), 212-225.
- Marcone C., 2014. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology* 165, 199–221.
- Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E., 1997. Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group. *European Journal of Forest Pathology* 27, 45–54.
- Marcone C., Lee I-M., Davis R.E., Ragozzino A., Seemüller E., 2000. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1703-1713.
- Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A., 1999. Identification and epidemic distribution of two “flavescence dorée”-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease* 83, 925-930.
- Martini M., Botti S., Marcone C., Marzachi C., Casati P., Bianco P.A., Benedetti R., Bertaccini A., 2002. Genetic variability among “flavescence dorée” phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes* 16(3), 197-208.
- Martini M., Lee I-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan A.J., Osler R., 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2037-2051.
- Martin-Trillo M., Cubas P., 2010. TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends of Plant Sciences* 15, 31-39.
- Matthewman C.A., Kawashima C. G., Hüska D., Csorba T., Dalmay T., Kopriva S., 2012. miR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in Arabidopsis. *FEBS Letters* 586(19), 3242-3248.
- Maust B.E., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaría J.M., Oropeza C., 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93, 976–981.
- McDowell J.M., Dangel J.L., 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science* 25, 79–82.

- Mehle N., Rupar M., Seljak G., Ravnikar M., Dermastia M., 2011. Molecular diversity of “flavescence dorée” phytoplasma strains in Slovenia. *Bulletin of Insectology* 64(Supplement), S29-S30.
- Mehle N., Seljak G., Rupar M., Ravnikar M., Dermastia M., 2010. The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (elm yellows) group in the mosaic leafhopper *Orientalus ishidae*. *New Disease Report* 22, 11.
- Meister G., Tuschl T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Melchior F., Kindl H., 1991. Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288, 552-557.
- Mellersh D.G., Foulds I.V., Higgens V.J., Heath M.C., 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *The Plant Journal* 29, 257–268.
- Metsalu T., Vilo J., 2015. Clustvis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research* 43, 566-570.
- Mhirsi M., Acheche H., Fattouch S., Boccoardo G., Marrakch Marzouk M., 2004. First report of phytoplasmas in the aster yellows group infecting grapevine in Tunisia. *New Disease Reports* 9, 5.
- Miotti L., 2013. Studio su *Catharanthus roseus* delle risposte di difesa indotte dal fitoplasma associato alla flavescenza dorata della vite e valutazione degli effetti di *Epicoccum nigrum* nella risposta della pianta alle prime fasi dell'infezione. (Tesi di dottorato, Università degli Studi di Udine, Italia).
- Mitrović J., Contaldo N., Paltrinieri S., Meja J. F., Mori N., Bertaccini A., Duduk B., 2011a. The use of *groEL* gene in characterisation of aster yellows phytoplasmas in field collected samples. *Bulletin of Insectology* 64(Supplement), S17-S18.
- Mitrović J., Kakizawa S., Duduk B., Oshima K., Namba S., Bertaccini A., 2011b. The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Annals of Applied Biology* 154(2), 219-229.
- Mittelberger C., Obkircher L., Oetti S., Oppedisano T., Pedrazzoli F., Panassiti B., Kerschbamer C., Anfora G., Janik K., 2017. The insect vector *Cacopsylla picta* vertically transmits the bacterium 'Candidatus Phytoplasma mali' to its progeny. *Plant Pathology* 66, 1015-1021.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. The reactive oxygen gene network in plants. *Trends in Plant Science* 9, 490–498.
- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rustérucci C., Dat J., Vande Cotte B., Agnel, J.-P., Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F., Triantaphylidés C., 2005. Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138, 1516–1526.
- Moreau M., Feuilloley M., Orange N., Brisset J., 2005. Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1039-1046.
- Moreau M., Feuilloley M., Veron W., Meylheuc T., Chevalier S., Brisset J., Orange, N. 2007. Gliding Arc Discharge in the potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: mechanism of lethal action and effect on membrane-associated molecules. *Applied and Environmental Microbiology* 73(18), 5904-5910.
- Moreau M., Orange N., Feuilloley M., 2008. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances* 26, 610–617.
- Mori N., Pavan F., Bondavalli R., Reggiani N., Paltrinieri S., Bertaccini A. 2008. Factors affecting the spread of “bois noir” disease in north Italy vineyards. *Vitis* 47, 65-72.
- Morone C., Boveri M., Giosué S., Gotta P., Rossi V., Scapin I., Marzachi C., 2007. Epidemiology of “flavescence dorée” in vineyards in northwestern Italy. *Phytopathology* 97, 1422–1427.
- Mott-Smith, H., 1971. History of “plasmas”. *Letter to Nature* 233, 219.
- Mou H-Q., Lu J., Zhu S-F., Lin C-L., Tian G-Z., Xu X., Zhao W-J., 2013. Transcriptomic analysis of paulownia infected by paulownia witches' broom phytoplasma. *PLoS ONE* 8, e77217.

- Mujib A., Ilah A., Aslam J., Fatima S., Siddiqui Z.H., Maqsood M., 2012. *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regulation* 68(2), 111–127.
- Müller K.O., Borger H., 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthorainfestans-Resistenz der Kartoffel. *Arbeitenb aus der Biolo-gischen Reichsanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 23, 189-231.
- Musetti R., 2010. Biochemical changes in plants infected by phytoplasma. In: *Phytoplasmas – Genomes, plant host and vectors*. CAB international (UK), 132-46.
- Musetti R., Sanità Di Toppi L., Martini M., Ferrini F., Loschi A., Favali M.A., Osler R., 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112, 53-61.
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanità di Toppi L., Borselli S., Borgo M., Osler R., 2007. On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv. Prosecco) from “flavescence dorée” disease. *Functional Plant Biology* 34, 750-758.
- Musetti R., Tubaro F., Polizzotto R., Ermacora P., Osler R., 2008. Il “recovery” da “apple proliferation” in melo è associato all’aumento della concentrazione degli ioni calcio nel floema. *Petria* 18(2), 380-383.
- Musetti R., Buxa S.V., De Marco F., Loschi A., Polizzotto R., Kogel K.H., van Bel A.J.E., 2013. Phytoplasma-triggered Ca<sup>2+</sup> influx is involved in sieve-tube blockage. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 379–386.
- Music M.S., Skoric D., Haluska I., Krizanac I., Plavec J., Mikec I., 2011. First report of flavescence dorée-related phytoplasma affecting grapevines in Croatia. *Plant Disease* 95, 353.
- Muto A., Osawa S., 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 84, 161-165.
- Nasim S.A., Dhir B., 2010. Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 203, 139–149.
- Nečas T., Mašková V., Krška B., 2008. The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. *Acta Horticulturae* 781, 443-448.
- Nehra V., Kumar A., Dwivedi H., 2008. Atmospheric non-thermal plasma sources. *International Journal of Engineering* 2(1), 53-68.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1237–1247.
- Nejat N., Vadamalai G., Dickinson M., 2012. Expression patterns of genes involved in the defense and stress response of *Spiroplasma citri* infected Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. *International Journal of Molecular Sciences* 13(2), 2301-2313.
- Nemestothy G.S., Guest D.I., 1990. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37(3), 207-219.
- Nicolaisen M., Horvath D.P., 2008. A branch-inducing phytoplasma in *Euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *Journal of Phytopathology* 156, 403–407.
- Noma K., Sugiyama T., Cam H., Verdel A., Zofall M., Jia S., Moazed D., Grewal S.I., 2004. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nature Genetics* 36, 1174-1180.
- Nopo-Olazabal C., Condori J., Nopo-Olazabal L., Medina-Bolivar F., 2014. Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiology and Biochemistry* 74, 50–69.
- Nürnberg T., 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 167-182.

- Oksman-Caldentey K.M., Inzè D., 2004. Plant cell factories in the post genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9, 433-440.
- Olazabal C.N., Condori J., Olazabal L.N., Bolivar F.M., 2014. Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiology and Biochemistry* 74, 50-69.
- Oleszek W., 2012. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108, 73-81.
- Olivier C.Y., Lowery D.T., Stobbs L.W., Vincent C., Galka B., Saguez J., Bittner L., Johnson R., Rott M., Masters C., Green M., 2009. First report of aster yellows phytoplasma ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') in Canadian grapevines. *Plant Disease* 93, 669.
- Orlovskis Z., Canale M.C., Hayrono M., Lopes J.R.S., Kuo C.H., Hogenhout 2017. A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany* 119(5), 869-884.
- Olson P.D., Varner J.E., 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal* 4, 887-892.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H-Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, 27-29.
- Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Ishii Y., Hoshi A., Hayashi, Y., Kagiwada S., Namba S., 2007. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of '*Candidatus Phytoplasma asteris*'. *Molecular Plant Pathology* 8, 481-489.
- Oshima K., Maejima K. Namba S., 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology* 4, 230.
- Osler R., Carraro L., Loi N., Refatti E., 1993. Symptom expression and disease occurrence of a yellows disease of grapevine in northeastern Italy. *Plant Disease* 77, 496-498.
- Özbek E., Miller S.A., Meulia T., Hogenhout S.A., 2003. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82, 167-175.
- Papp I., Mette M.F., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S.E., Ray A., van der Winden J., Matzke M., Matzke A.J., 2003. Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology* 132, 1382-1390.
- Pappas D., 2011. Status and potential of atmospheric plasma processing of materials. *Journal of Vacuum Science & Technology A* 29, 020801-1.
- Park D., Davis K., Gilani S., Alonzo C., Dobrynin D., Friedman G., Fridman A., Rabinovich A., Fridman G., 2013. Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. *Current Applied Physics* 13(1), 19-29.
- Park S.W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessig D.F., 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318(5847), 113-116.
- Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12, 1484-1495.
- Parmessur Y., Aljanabi S., Saumtally S., Dookun-Saumtally A., 2002. Surgacane yellow leaf virus and surgacane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology* 51(5), 561-566.
- Patui S., Bertolini A., Clincon L., Ermacora P., Braidot E., Vianello A., Zancani M., 2013. Involvement of plasma membrane peroxidases and oxylipin pathway in the recovery from phytoplasma disease in apple (*Malus domestica*). *Physiology Plant* 148, 200-213.
- Pavlik M., Vacek J., Klejdus B., Kuban V., 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyljasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6147-6153.
- Peng G., Xi B., Liang Y., Dekang L., Yong L., Hua C., Wei J., Dianjing G., Yanming Z., 2010. Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta* 231, 991-1001.

- Perez Fuentealba S.M., 2016. Evaluation of biofungicides and plant defence elicitors against bacterial pathogens of agronomic importance. (PhD thesis, *Alma Mater Studiorum-Università di Bologna*).
- Pertot I., Musetti R., Pressacco L., Osler R., 1998. Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* 95, 13–23.
- Peter D.J., Constabel C.P., 2002. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Journal* 32(5), 701-712.
- Petitpas G., Rollier J.D., Darmon A., Gonzalez-Aguilar J., Metkemeijer R., Fulcheri L., 2007. A comparative study of non-thermal plasma assisted reforming technologies. *International Journal of Hydrogen Energy* 32(14), 2848-2867.
- Pezet R., Gindro K., Viret O., Spring J.L., 2004. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(6), 297-303.
- Pieterse C.M.J., van Loon L.C., 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 4, 52–58.
- Pisi A., Marani F., Bertaccini A., 1981. Mycoplasma-like organism associated with elm witches'-broom symptoms. *Phytopathologia Mediterranea* 20, 189-191.
- Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Giullietti A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 252–258.
- Prakash P., Ghosliya D., Gupta V., 2015. Identification of conserved and novel microRNAs in *Catharanthus roseus* by deep sequencing and computational prediction of their potential “target”s. *Gene* 554, 181-195.
- Pracros P., Renaudin J., Eveillard S., Mouras A., Hernould M., 2006. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19, 62-68.
- Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R., Barba M., 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83, 1130-1137.
- Qian Z.G., Zhao Z.J., Xu Y., Qian X., Zhong J.J., 2004. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 809-816.
- Qu F., Ye X., Morris T.J., 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceeding of the National Academy of Sciences United States of America* 105, 14732-14737.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E., 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with “stolbur”- and “bois noir”-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2879–2894.
- Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37, 91-102.
- Rajagopalan R., Vaucheret H., Trejo J., Bartel D.P., 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 20, 3407–3425.
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 13339(1), 62-66.
- Rashid U., Bilal S., Bhat K.A., Shah T.A., Wani T.A., Bhat F.A., Mughal M.N., Nazir N., 2018. Phytoplasma effector and their role in plant-insect interaction. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(2), 1136-1148.

- Razin S., Yogeve D., Naot Y., 1998. Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1094–1156.
- Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6, 27.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Reisenzein H., Steffek R., 2011. First outbreaks of grapevine ‘flavescence dorée’ in Austrian viticulture. *Bulletin of Insectology* 64(Supplement), S223-S224.
- Resende M.L.V., Nojosa G.B.A., Cavalcanti L.S., Aguilar M.A.G., Silva L., Perez J., Andrade G., Carvalho G.A., Castro R.M., 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51(5), 621–8.
- Rhoades M.W., Reinhart B.J., Lim L.P., Burge C.B., Bartel D.P., 2002. Prediction of plant microRNA “target”s. *Cell* 110, 513-520.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* 14, 1902-1910.
- Roewer I.A., Cloutier N., Van der Heijden R., 1992. Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase, (SS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* 11(2), 86–89.
- Rogers K., Chen X., 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25, 2383–2399.
- Romanazzi G., Prota V.A., Casati P., Murolo S., Siletti M.R., Di Giovanni R., Landi L., Zorloni A., D'Ascenzo D., Virgili S., Garau R., Savini V., Bianco P.A., 2007. Incidence of recovery in grapevines infected by phytoplasma in different Italian climatic and varietal conditions and attempts to understand and promote the phenomenon. Workshop on Innovative strategies to control grapevines and stone fruit phytoplasma based on recovery, induced resistance and antagonist, Ancona, 9-11.
- Romanazzi G., Murolo S., 2008. Partial uprooting and pulling to induce recovery in “bois noir” infected grapevines. *Journal of Phytopathology* 156, 47-750.
- Romanazzi G., Murolo S., Feliziani E., 2013. Effects of an innovative strategy to contain grapevine “bois noir”: field treatment with resistance inducers. *Phytopathology* 103(8), 785-791.
- Rott R., Johnson C., Masters C., Green M., 2007. First report of “bois noir” phytoplasma in grapevine in Canada. *Plant Disease* 91(12), 1682.
- Ruijter J.M., Pfaffl M.W., Zhao S., Spiess A.N., Boggy G., Blom J., Rutledge R.G., Sisti D., Lievens A., De Preter K., Derveaux S., Hellemans J., Vandesompele J., 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods* 59, 32-46.
- Rubio-Somoza I., Weigel D., 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science* 16(5), 258-64.
- Salem N.M., Quaglino F., Abdeen A., Casati P., Bulgari D., Alma A., Bianco P.A., 2013. First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ strains associated with grapevine bois noir in Jordan. *Plant Disease* 97(11), 1505.
- Sambrook J., Russell D.W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).
- Samukawa S., Hori M., Rauf S., Tachibana K., Bruggeman P., Kroesen G., Christopher Whitehead J., Murphy A.B., Gustol A.F., Starikovskaia S., Kortshagen U., Boeuf J.P., Sommerer T.J., Kushner M.J., Czarnetzki U., Mason N., 2012. The 2012 plasma roadmap. *Journal of Physics D: Applied Physics* 45, 253001.

- Sarik A., Skoric D., Bertaccini A., Vibio M., Murari E., 1997. Molecular detection of phytoplasmas infecting grapevines in Slovenia and Croatia. 12<sup>th</sup> meeting of the international council for the study of virus and virus-like diseases of grapevine (ICVG), Lisbona, Portogallo, 77-78.
- Satta E., 2017. Studies on phytoplasma seed transmission in different biological systems. (PhD Thesis, *Alma Mater Studiorum-Università di Bologna*).
- Satta E., Paltrinieri S., Contaldo N., Bertaccini A., 2017. Trasmissione di fitoplasmi attraverso il seme. VII Incontro Nazionale sui fitoplasmi e le malattie da fitoplasmi, Grugliasco (TO), 33.
- Sasabe M., Takeuchi K., Kamoun S., Ichinose Y., Govers F., Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T., 2000. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry* 267, 5005–5013.
- Shikata M., Yamaguchi H., Sasaki K., Ohtsubo N., 2012. Overexpression of *Arabidopsis* miR157b induces bushy architecture and delayed phase transition in *Torenia fournieri*. *Planta* 236, 1027-1035.
- Schnee S., Viret O., Gindro K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72, 128-133.
- Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 139, 519-527.
- Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tuf gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.
- Schommer C., Palatnik J.F., Aggarwal P., Chetelat A., Cubas P., Farmer E.E., Nath U., Weigel D., 2008. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 “target”s. *PLoS Biology* 6, 230.
- Schröder J., 1999. Probing plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* 6, 714-716.
- Schröder G., Beck M., Eichel J., Vetter H.P., Schöder L., 1993. HSP90 homologue from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): CDNA sequence, regulation of protein expression and location in the endoplasmic reticulum. *Plant Molecular Biology* 23, 583-594.
- Schulze-Lefert P., 2004. Knocking on the heaven’s wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 377–383.
- Schvester D., Carle P., Moutous M., 1961. Sur la transmission de la flavescence dorée des vignes par une cicadelle. *Comptes Rendus des Séances de l’Académie d’Agriculture de France* 47, 1021-1024.
- Schwab R., Palatnik J.F., Riester M., Schommer C., Schmid M., Weigel D., 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* 8, 517–527.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Schwarz S., Grande A.V., Bujdoso N., Saedler H., Huijser P., 2008. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 67, 183-195.
- Sears B.B., Lim P.O., Holland N., Kirkpatrick B.C., Klomparens K.L., 1989. Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Molecular Plant Microbe Interaction* 2, 175-180.
- Seruga M., Škorić D., Botti S., Paltrinieri S., Juretic N., Bertaccini A., 2002. Molecular identification of a phytoplasma naturally infecting *Populus nigra* L. cv. *Italica* trees in Croatia. *Plant Protection Science* 38, 28-30.
- Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudin-Padieu E., 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of “bois noir” of grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 146, 549–556.

- Shao F., Zhang Q., Liu H., Lu S., Qiu D., 2016. Genome-wide identification and analysis of microRNAs involved in witches' broom phytoplasma response in *Ziziphus jujube*. *PLoS ONE* 11, E0166099.
- Shen D., Suhrkamp I., Wang Y., Liu S., Menkhous J., Verreet J.A., Fan L., Cai D., 2014. Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using Brassica AA (*Brassica rapa*) and CC (*Brassica oleracea*) as reference genomes. *New Phytologist* 204, 577-594.
- Shen E.M., Singh S. K., Gosh J.S., Patra B., Paul P., Yuan L., Pattanaik S., 2017. The miRNAome of *Catharanthus roseus*: identification, expression analysis, and potential roles of microRNAs in regulation of terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports* 22(7), 43027.
- Sheskin D.J., 2004. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 3th ed. Boca Raton, Chapman & Hall / CRC.
- Shetty N.P., Mehrabi R., Lütken H., Haldrup A., Kema G.H. J., Collinge D. B., Jorgensen H.J., 2007. Role of hydrogenperoxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *The New Phytologist* 174, 637-647.
- Shibuya N., Minami, E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59(5), 223-233.
- Shikata M., Yamaguchi H., Sasaki K., Ohtsubo N., 2012. Overexpression of *Arabidopsis* miR157b induces bushy architecture and delayed phase transition in *Torenia fournieri*. *Planta* 236(4), 1027-35.
- Shishoo R., 2007. Plasma technologies for textiles, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Carneiro N., Souto A.P., Silva E., Marimba A., Tena B., Ferreira H., Magalhaes V., 2001. Dyeability of corona-treated fabrics. *Coloration Technology* 117, 298.
- Sieber P., Wellmer F., Gheyselinck J., Riechmann J.L., Meyerowitz E.M., 2007. Redundancy and specialization among plant microRNAs: Role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* 134, 1051-1060.
- Siemens W., 1857. Ueber die elektrostatische induction und die Verzögerung des Stroms in Flaschendraht. *Poggendorff's Annalen Physik Chemie* 102, 66.
- Silja P.K., Gisha G.P., Satheeshkumar K., 2014. Enhanced plumbagin accumulation in embryogenic cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. following elicitation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 119, 469-477.
- Škorić D., Šarić A., Vibio M., Murari E., Krajačić M., Bertaccini A., 1998. Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. *Vitis* 37, 171-175.
- Smart C., Myers K., Restrepo S., Martin G., Fry W., 2003. Partial resistance of tomato to *Phytophthora infestans* is not dependent upon ethylene, jasmonic acid, or salicylic acid signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 16(2), 141-148.
- Snyman M.C., Solofoharivelo M.C., Souza-Richards R., Stephan D., Murray S., Burger J.T., 2017. The use of high-throughput small RNA sequencing reveals differentially expressed microRNAs in response to aster yellows phytoplasma-infection in *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay'. *PLoS ONE* 12(8): e0182629.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry* 30, 91-113.
- Song L., Axtell M.J., Fedoroff N.V., 2010. RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Current Biology* 20, 37-41.
- Sottomayor M., Lopes Cardoso I., Pereira L.G., Ros Barcelò A., 2004. Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Reviews* 3, 159-171.
- Sousa E., Casati P., Cardoso F., Baltazar C., Durante G., Quaglino F., Bianco P.A., 2010. Flavescence dorée phytoplasma affecting grapevine (*Vitis vinifera*) newly reported in Portugal. *Plant Pathology* 59(2), 398.

- Stadler R., Wright K., Lauterbach C., Amon G., Gahrtz M., 2005. Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant Journal* 41, 319-31.
- Stepien A., Knop K., Dolata J., Taube M., Bajczyk M., Barciszewska-Pacak M., Pacak A., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z., 2016. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA* 8, e1403.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux A. J., 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35(1), 235-270.
- Strauss E., 2009. Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325, 388- 390.
- Su Y.T., Chen J.C., Lin C.p., 2011. Phytoplasma-induced floral abnormalities in *Catharanthus roseus* are associated with phytoplasma accumulation and transcript repression of floral organ identity genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 1502-1512.
- Sugawara K., Honma Y., Komatsu K., Himeno M., Oshima K., Namba S., 2013. The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiology* 162, 2005–2014.
- Sugio A., Heather N.K., Allyson M.M., Victoria M.G., Saskia A.H., 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defence hormone biosynthesis. *Plant Biology* 108, 1254-1264.
- Sugio A., Hogenhout S.A., 2012. The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion Microbiology* 15, 247–254.
- Sun J., Manmathan H., Sun C., Peebles C.A.M., 2016. Examining the transcriptional response of overexpressing anthranilate synthase in the hairy roots of an important medicinal plant *Catharanthus roseus* by RNA-seq. *BMC Plant Biology* 16, 108.
- Sunkar R., Kapoor A., Zhu J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18(8), 2051-2065.
- Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G., 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17, 196–203.
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.-Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M., Namba S., 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4252–4257.
- Tang Z., Yang L., Zu Y., Guo X., 2009. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Growth Regulation* 57(1), 15-20.
- Tanne E., Orenstein S., 1997. Identification and typing of grapevine phytoplasma amplified by graft transmission to periwinkle. *Vitis* 36, 35-38.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A., 2006. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55, 18–24.
- Tedeschi R., Alma A., 2006. *Fieberiella florii* (Homoptera:Auchenorrhyncha) as a vector of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’. *Plant Disease* 90(3), 284-290.
- Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmaison J., Leprince P., 2006. Atmospheric pressure plasma: a review. *Spectrochimica Acta Part B* 61, 2-30.
- Thirumdas R., Kothakota A., Annapure U., Siliveru K., Blundell R., Gatt R., Valdramidis V.P., 2018. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in food Science & Technology* 77, 21-31.
- Torres E., Botti S., Rahola J., Martin M.P., Bertaccini A., 2005. Grapevine yellow diseases in Spain: eight year survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasma involved. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62, 127-133.
- Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J L., 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141, 373–378.

- Trivellone V., Filippin L., Jermini M., Angelini E., 2015. Molecular characterization of phytoplasma strains in leafhoppers inhabiting the vineyard agroecosystem in Southern Switzerland. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1-Supplement), S45-S46.
- Tukey J.W., 1977. Exploratory data analysis. Addison-Wesley, reading, Massachusetts, USA.
- Unger C., Kleta S., Jandl G., Tiedemann, A., 2005. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 153, 15–26.
- Válóczi A., Hornyik C., Varga N., Burgyán J., Kauppinen S., Havelda Z., 2004. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* 32(22), 175.
- Van Breusegem F., Dat J.F., 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141, 384–390.
- Van Loon L.C., Geraats B.P., Linthorst H.J., 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11(4), 184-191.
- Várallyay E., Válóczi A., Agyi A., Burgyán J., Havelda Z., 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO Journal* 29, 3507-3519.
- Vaucheret H., Mallory A.C., Bartel D.P., 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of *MIR168* and *AGO1* and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular Cell* 22, 129-136.
- Verma P., Kumar M.A., Srivastava A., Mathur A., 2012. Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma* 249, 255-268.
- Verport R., Memelink J., 2000. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 181-187.
- Vijverberg K., D'agostino N., Gerats T., 2016. Identification of conserved miRNAs in *Petunia axillaris* and *P. inflata* young flower buds and their verification in the *Petunia* genome sequence. *Nature Plants* Supplemento, 1-60.
- Wang Q., Valkonene J.P.T., 2008. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathology* 4, 819-823.
- Wang X., Zhang S., Dou Y., Zhang C., Chen X., Yu B., Ren G., 2015. Synergistic and independent actions of multiple terminal nucleotidyl transferases in the 3' 0' tailing of small RNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 11, e1005091.
- Wasternack C., Parthier B., 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2, 302–307.
- Wei S., 2010. Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Growth Regulation* 61, 243–251.
- Wei W., Kakizawa S., Jung H.Y., Suzuki S., Tanaka M., Nishigawa H., Miyata S., Oshima K., Ugaki M., Hibi T., Namba S., 2004. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology* 94(7), 683-686.
- Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16S subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2368–2377.
- Wei W., Davis R.E., Nuss D.L., Zhao Y., 2013. Phytoplasmal infection derails genetically preprogrammed meristem fate and alter plant architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(47), 19149-19154.
- Wei W., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2015. Occurrence, distribution and possible functional roles of simple sequence repeats in phytoplasma genomes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 2748-2760.

- Weintraub P.G., Wilson M.R., 2009. Control of phytoplasma diseases and vectors. In: *Phytoplasmas: genome, plant hosts and vectors*. Ed. P.G. Weintraub and P. Jones. pagg. 233-249. CABI, Wallingford, UK.
- Weintraub P.G., Jones P., 2010. *Phytoplasma: Genomes, Plant host and vectors*. Oxfordshire, U.K., CAB International.
- Wendehenne D., Durner J., Klessig D. F., 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7(4), 449-455.
- Wink M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19.
- Wongkaew P., Fletcher J., 2004. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. *Plant Cell Reports* 23, 426-434.
- Wu G.S., Short B.J., Lawrence E.B., Levine E. B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M., 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell* 7, 1357-1368.
- Wu J., Baldwin I.T., 2010. New insight into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics* 44, 1-24.
- Wu L., Liu D., Wu J., Zhang R., Qin Z., Liu D., Li A., Fu D., Zhai W., Mao L., 2013. Regulation of FLOWERING LOCUS T by a MicroRNA in *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell* 25(11), 4363-4377.
- Xia X-J., Wang Y-J., Zhou Y-H., Tao Y., Mao W-H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q., 2009. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology* 150, 801-814.
- Xie K., Wu C., Xiong L., 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology* 142, 280-293.
- Xie K., Shen J., Hou X., Yao J., Li X., Xiao J., Xiong L., 2012. Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant Physiology* 158, 1382-1394.
- Xie Z., Allen E., Fahlgren N., Calamar A., Givan S.A., Carrington J.C., 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology* 138, 2145-2154.
- Xu A., Zhan J.C., Huang W.D., 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 122, 197-211.
- Xu J., Yin H.X., Li X., 2009. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micro-propagated hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports* 28, 325-333.
- Yamada Y., Sato F., 2013. Transcription factors in alkaloid biosynthesis. *International Review of Cell and Molecular Biology* 305, 339-82.
- Yamamoto N.G., Wan G.H., Masaki K., Kobayashi S., 2002. Structure and transcriptional of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science* 162, 867-872.
- Yan J., Zhao C., Zhou J., Yang Y., Wang P., Zhu X., Tang G., Bressan R., Zhu J.K., 2016. The miR165/166 mediated regulatory module plays critical roles in ABA homeostasis and response in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 12(11), 1006416.
- Yang L., Wu G., Poethig R.S., 2012. Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109, 315-320.
- Yang X., Ren W., Zhao Q., Zhang P., Wu F., He Y., 2014. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Research* 42, 12224-12236.
- Yu M., Yun B. W., Spoel S. H., Loake G. J., 2012. A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology* 15(4), 424-430.
- Yu Y., Tianran J., Xuemei C., 2017. The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytologist* 216, 1002-1017.

- Yun B., W. Feechan A., Yin M., Saidi N.B., Le Bihan T., Yu M., Pallas J.A., 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478(7368), 264-268.
- Zambon Y., 2014. Caratterizzazione molecolare multigenica di fitoplasmi associati a giallumi della vite in Itali e Sud Africa. (Master Thesis, *Alma Mater Studiorum-Università di Bologna*).
- Zambon Y., Canel A., Bertaccini A., Contaldo N., 2018. Molecular diversity of phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in North-Eastern Italy. *Phytopathology* 108, 206-214.
- Zeng Y., 2006. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 25, 6156-6162.
- Zhang J., Hogenhout S.A., Nault L.R., Hoy C.W., Miller S.A., 2004. Molecular and symptom analyses of phytoplasma strain from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology* 94, 842-849.
- Zhang S., Zhou J., Han S., Yang W., Li W., Wei H., Li X., Qi L., 2010. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398(3), 355-60
- Zhang W., Gao S., Zhou X., Chellappan P., Chen Z., Zhou X., Zhang X., Fromuth N., Coutino G., Coffey M., Jin H., 2011b. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology* 75, 93-105.
- Zhang Z.L., Ogawa M., Fleet C.M., Zentella R., Hu J., Heo J.O., Lim J., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sun T.P., 2011. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 108(5), 2160-2165.
- Zhao Y., Wei W., Lee I-M., Shao J., Suo X., Davis R.E., 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2582-2593.
- Zhou F., Menke F.L.H., Yoshioka K., Moder W., Shirano Y., Klessig D.F., 2004. High humidity suppresses ssi4-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and defense gene expression. *The Plant Journal* 39, 920-932.
- Zhu H., Hu F., Wang R., Zhou X., Sze S.H., Liou L.W., Barefoot A., Dickman M., Zhang X., 2011. *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* 145, 242-256.
- Zhu L., Gunn C., Beckman J.S., 1992. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298, 452-457.
- Zhu Q.H., Helliwell C.A., 2011. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of Experimental Botany* 62, 487-495.
- Zwerger K., Hirt H. 2001. Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biological Chemistry* 382, 1123-1131.

## APPENDICI

---

### Appendice 1.

#### Estrazione degli acidi nucleici

Il DNA totale delle piante è stato estratto usando per ogni campione 1 g di nervature fogliari secondo il metodo descritto da Prince *et al.*, 1993 con alcune modifiche. I campioni sono stati polverizzati in azoto liquido con pestello e mortaio sterili in 8 ml di un tampone contenente 95 mM  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 30 mM  $KH_2PO_4$ , 10% saccarosio, 0,15% BSA (siero albumina bovina, frazione V), 2% polivinilpirrolidone 10, il tutto a pH 7,6. La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 11.400 rpm per 30 min a 4°C in una centrifuga refrigerata Allegra 64R (Beckman, Coulter, Germania). Il sopranatante è stato allontanato ed il "pellet", disciolto in 4 ml di tampone di estrazione (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl), è stato trattato con 80 µl di proteinasi K e 440 µl di 10% sarkosyl. Il preparato è stato incubato per 1 ora a 55°C. Dopo una centrifugazione a 8.000 rpm per 10 minuti a 4°C, è stato prelevato il sopranatante al quale sono stati aggiunti 2,5 ml di isopropanolo per ottenere la precipitazione dell'acido nucleico grezzo; il tutto è stato incubato a -20°C per 30 minuti. I campioni sono stati poi centrifugati a 8.000 rpm per 15 minuti, ed il "pellet" risospeso in 3 ml di tampone TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a pH 8,0) aggiungendo 60 µl di proteinasi K e 75 µl di sodio dodecilsolfato (SDS) 20% ed incubato a 37°C per 1 ora. Dopo l'aggiunta di 525 µl di NaCl 5 M e 420 µl di alchiltrimetilammonio bromuro (10% CTAB) in 0,7 M NaCl, la soluzione è stata incubata per 10 minuti a 65°C. I campioni sono stati ulteriormente trattati mediante trattamento con 2 ml di fenolo saturato con TE e 2 ml di cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1); poi con 4 ml cloroformio. Terminata l'estrazione con i solventi organici, il sopranatante è stato trasferito in un tubo corex, con aggiunta di 2,5 ml di isopropanolo, in cui è stato lasciato a precipitare per una notte a 4°C. Successivamente è seguita una centrifugazione a 11.000 rpm per 30 minuti a 4°C; il "pellet" è stato addizionato con 1 ml di etanolo 70% a freddo e dopo un'ultima centrifugazione (11.000 rpm per 10 minuti a 4°C) i campioni sono stati risospesi in 120 µl di tampone TE e mantenuti a 4°C. La concentrazione e la purezza dell'acido nucleico estratto sono state verificate analizzando allo spettrofotometro (Pharmacia, Gene Quant) la curva di assorbanza di aliquote di 3,5 µl di ogni campione dissolto in 346,5 µl di tampone TE, poste in cuvette di quarzo dal passo di 10 mm.

## Appendice 2.

### Analisi del gene ribosomico 16S

Aliquote di DNA totale estratto dalle piante sono state usate nelle successive analisi di PCR e PCR-“nested” per l’identificazione di fitoplasmi in piante di vinca e vite. In particolare, 20 ng di DNA sono stati aggiunti in 25 µl di una miscela di reazione contenente 17,5 µl di H<sub>2</sub>O, 2,5 µl di tampone 10x (Sigma, Germania), 2 µl d-NTP 2,5 mM, 0,5 µl dei "primers" 20 µM, 1 µl di Taq DNA polimerasi 5 U/µl Sigma. Le PCR-“nested” sono state effettuate utilizzando una diluizione 1: 30 dell’amplicone ottenuto nelle PCR precedenti. I “primers” utilizzati sono riportati in tabella 1A. Sono stati utilizzati i "primers" R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee 1996) in PCR diretta e le coppie di "primers" U5/U3 e 16R758f/16R1232r (Lorenz *et al.*, 1995; Gibb *et al.*, 1995) per le successive PCR-“nested”. La miscela di reazione è stata preparata in provette Eppendorf da 0,5 ml e sottoposta a 35 cicli come segue: denaturazione del DNA per un minuto a 94°C, accoppiamento dei “primers” per 2 minuti a 50 o 55°C e sintesi del nuovo filamento a 72°C per 3 minuti (10 minuti nell’ultimo ciclo).

Primers	Sequenza	Bibliografia
R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	(Gundersen e Lee, 1996)
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	(Lee <i>et al.</i> , 1993)
U3	5'- CGGCAATGGAGGAAACT-3'	(Lorenz <i>et al.</i> , 1995)
U5	5'- TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'	(Lorenz <i>et al.</i> , 1995)
16R758f (M1)	5'-GTC TTT ACT GAC GCT GAG GC-3'	(Gibb <i>et al.</i> , 1995)
16R1232r (M2)	5'-CTT CAG CTA CCC TTT GTA AC-3'	(Gibb <i>et al.</i> , 1995)

Tabella 1A. "Primers" utilizzati per l’amplificazione genica.

Al termine delle amplificazioni, aliquote di 6 µl di ogni campione sono state sottoposte ad elettroforesi orizzontale in gel di agarosio 1% in tampone TA (TRIS-acetato 1,04 M, EDTA 0,002 M) per 20 minuti a 120 V. La visualizzazione della reazione è stata ottenuta con colorazione al bromuro di etidio 1% in acqua per 10 minuti, ed osservazione e foto agli ultravioletti ad una lunghezza d'onda di 312 nm. Aliquote degli ampliconi ottenuti (circa 300 ng) sono state sottoposte a restrizione con gli enzimi *TruII*, *TaqI* e *Tsp509I* (Fermentas, Lithuania) a 65°C per 10 minuti. Per evidenziare i profili derivanti dalla digestione enzimatica, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi verticale

a 200 V per 50 minuti in cella "Aquabogues-machine" (New York, USA) in gel di poliacrilammide al 6,75% in tampone 1 X TBE [TRIS-borato 0,09 M ed acido borico ( $H_3BO_3$ ) 0,09 M].

### Appendice 3.

#### Micropropagazione e substrato di crescita

Come prima cosa è stato preparato il substrato di crescita (Tabella 2A) sono stati addizionati 30 gr di saccarosio, 7 gr di agar e 2,4 ml di 6-benzilamminopurina (5 mg/l), a pH 5,7 e sterilizzato mediante autoclave. L'operazione di moltiplicazione è stata eseguita in ambiente sterile sotto cappa biologica a flusso laminare verticale con strumentazione sterilizzata.

Macronutrienti		Micronutrienti		Vitamine	
KNO <sub>3</sub>	1,90 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20 mg/l	A. nicotinic	0,5 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65 g/l	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,30 mg/l	Glicina	2 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 g/l	ZnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	8,60 mg/l	Piridossina	0,5 mg/l
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,44 g/l	KJ	0,83 mg/l	Tiamina	0,1 mg/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,37 g/l	NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l	Mio-inositolo	100 mg/l
Fe-EDTA	0,04 g/l	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l		
		CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l		

Tabella 2A. Composizione del substrato di crescita dei germogli di vinca.

### Appendice 4.

#### Preparazione gel denaturante di poliacrilammide 8% in TBE

Prima di iniziare la preparazione del gel è di fondamentale importanza pulire la struttura verticale ove avverrà la corsa elettroforetica, i vetri, il pettine, gli "spacer", mediante l'utilizzo di un detergente e risciacquando il tutto con acqua deionizzata sterile. Si utilizzano vetri di dimensione 20x20 cm e "spacer" larghi 1.5 mm. A questo punto si prepara il gel composto da 40 g di urea, 8 ml di 10xTBE (0,9 M Tris, 0,9 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,02 M EDTA; pH 8.0) e 20 ml della soluzione acrilamide-bisacrilamide (19:1) ottenendo una soluzione finale di acrilamide dell'8% (vol/vol) in 80 ml di soluzione. Il tutto viene riscaldato mediante microonde, raffreddato ed addizionato di 480 µl 10% APS (ammonio persolfato) e 32 µl di TEMED (Sigma, # T-8122); la soluzione così ottenuta viene versata tra i vetri e lasciata polimerizzare (1-2 ore). Dopo la polimerizzazione si procede togliendo il pettine e ponendo i vetri contenenti il gel nella struttura verticale; viene aggiunto 1xTBE fino a coprire totalmente i pozzetti i quali vengono puliti mediante l'utilizzo di una piccola siringa. Infine, viene eseguita una

corsa a vuoto a 100 V per circa un ora allo scopo di riscaldare il gel e favorire condizioni di denaturazione appropriate.

## Appendice 5.

### Appezamenti selezionati per la sperimentazione di campo

Vigneto n° 1	
Azienda	Cesca Fabio
Comune	Farra di Soligo
Via	Sernaglia
Varietà	Chardonnay
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2007
Incidenza della malattia	7-8%
Prova svolta	Effetto PAW su GY



<b>Vigneto n° 2</b>	
Azienda	Cesca Fabio
Comune	Farra di Soligo
Via	San Tiziano
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2005
Incidenza della malattia	4%
Prova svolta	Effetto PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 3</b>	
Azienda	Moschetta Giovanni
Comune	Farra di Soligo
Via	Croda
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1998
Incidenza della malattia	5%
Prova svolta	Effetto PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 4</b>	
Azienda	Ceschin Cristian
Comune	Refrontolo
Via	Mire basse
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2008
Incidenza della malattia	3%
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi Eff. PAW su produzione



<b>Vigneto n° 5</b>	
Azienda	Dalto Paolo
Comune	Refrontolo
Via	Della Vittoria
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2008
Incidenza della malattia	6%
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi Eff. PAW su produzione



<b>Vigneto n° 6</b>	
Azienda	Bottega Pierpaolo
Comune	Miane
Via	Cavallot
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1999-2002
Incidenza della malattia	4%
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 7</b>	
Azienda	Merotto Stefano
Comune	Farra di Soligo
Via	Sernaglia
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2012
Incidenza della malattia	3%
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 8</b>	
Azienda	Rosolen Giuseppe
Comune	Refrontolo
Via	Colvendrame
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	guyot
Anno d'impianto	2008
Incidenza della malattia	6%
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 9</b>	
Azienda	Putin Oscar
Comune	Farra di soligo
Via	/
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	guyot
Anno d'impianto	2005
Incidenza della malattia	3-4 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 10</b>	
Azienda	Dorigo Luciano
Comune	Farra di soligo
Via	Cal del Poz
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1995
Incidenza della malattia	5 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 11</b>	
Azienda	Merotto Spumanti
Comune	Farra di soligo
Via	Scandolera
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1997
Incidenza della malattia	5 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 12</b>	
Azienda	Biscaro Alfio
Comune	Farra di soligo
Via	Scandolera
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	2005
Incidenza della malattia	3 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi Eff. PAW su produzione



<b>Vigneto n° 13</b>	
Azienda	Bariviera Vito
Comune	San Fior
Via	Palù
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	guyot
Anno d'impianto	2000
Incidenza della malattia	4 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 14</b>	
Azienda	Bariviera Vito
Comune	San Fior
Via	Palù
Varietà	Chardonnay
Sesto d'impianto	belussi
Anno d'impianto	1989
Incidenza della malattia	7 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 15</b>	
Azienda	Uliana Remo
Comune	Colle Umberto
Via	Faliero Marin
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	belussi
Anno d'impianto	1985
Incidenza della malattia	6 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



<b>Vigneto n° 16</b>	
Azienda	Canel Alessandro
Comune	Col San Martino
Via	Via Canal Vecchio
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1979
Incidenza della malattia	7 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi Eff. PAW su produzione



<b>Vigneto n° 17</b>	
Azienda	Canel Adamo
Comune	Col San Martino
Via	Castelletto
Varietà	Glera
Sesto d'impianto	sylvoz
Anno d'impianto	1980
Incidenza della malattia	8 %
Prova svolta	Eff. PAW sui giallumi



## Appendice 6.

### Impostazione della prova di campo

Vigneto	Vite	Gravità Sintomi	Selezionate in relazione a:		Tesi	Studio dell'effetto:	
			PCR	sintomi		"curativo"	"preventivo"
2	1D	1		SINTOMATICA	PAW	X	
	2D	0	16SrX		PAW	X	
	3D	0		SINTOMATICA	PAW		X
	4D	4	16SrV-A		H <sub>2</sub> O	X	
1	5D	0		NON SINT.	PAW		X
	6D	4	16SrV		PAW	X	
	7D	4	16SrV		PAW	X	
	8D	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	9D	1		SINTOMATICA	PAW	X	
	10D	1		SINTOMATICA	PAW	X	
	3	1H	1	16SrI		PAW	X
2H		1		SINTOMATICA	PAW	X	
3H		0		NON SINT.	PAW		X
4H		2.5	16SrV		PAW	X	
5H		0		NON SINT.	PAW		X
6H		1		SINTOMATICA	H <sub>2</sub> O	X	
7H		0		NON SINT.	PAW		X
8H		1	16SrI		H <sub>2</sub> O	X	
4	1F	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	2F	1	16SrI		PAW	X	
	3F	0		NON SINT.	PAW		X
	4F	1		SINTOMATICA	PAW	X	
	5F	1	16SrI		PAW	X	
	6F	0	NEG.		PAW		X
	7F	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	8F	1	16SrI		H <sub>2</sub> O	X	
14	1C	5	16SrXII-A		PAW	X	
	2C	5	16SrXII-A		H <sub>2</sub> O	X	
	3C	2	16SrV-C		PAW	X	
	4C	3	16SrV-D		PAW	X	
	5C	5	16SrXII-A		H <sub>2</sub> O	X	
	6C	0	NEG.		PAW		X
	7C	0	NEG.		PAW		X
	8C	3	16SrV-C		H <sub>2</sub> O	X	
	9C	3	16SrXII-A		PAW	X	
	10C	0	16SrX		PAW	X	

	<b>11C</b>	3	16SrV-C		PAW	X	
	<b>12C</b>	4	16SrXII-A		PAW	X	
	<b>13C</b>	4	16SrV-C		PAW	X	
	<b>14C</b>	4	16SrV-C		PAW	X	
13	<b>1B</b>	1	16SrI		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>2B</b>	1	16SrV-C		PAW	X	
	<b>3B</b>	2	16SrV-D		PAW	X	
	<b>4B</b>	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	<b>5B</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>6B</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>7B</b>	3		SINTOMATICA	H <sub>2</sub> O	X	
	<b>8B</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>9B</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>10B</b>	3		SINTOMATICA	H <sub>2</sub> O	X	
	<b>11B</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>12B</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>13B</b>	0		NON SINT.	PAW		X
17	<b>1E</b>	5	16SrV-A		PAW	X	
	<b>2E</b>	4	NEG.		PAW		X
	<b>3E</b>	3	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	<b>4E</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
16	<b>1A</b>	4	16SrV-C		PAW	X	
	<b>2A</b>	4	16SrV-C		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>3A</b>	3	16SrXII-A		PAW	X	
	<b>4A</b>	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	<b>5A</b>	0	NEG.		PAW		X
	<b>6A</b>	0	NEG.		PAW		X
	<b>7A</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>8A</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>9A</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>10A</b>	4		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>11A</b>	4		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>12A</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>13A</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>14A</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>15A</b>	0		NON SINT.	H <sub>2</sub> O		X
11	<b>1Z</b>	2	16SrV-C		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>2Z</b>	3	16SrV-C		PAW	X	
	<b>3Z</b>	2	16SrI		PAW	X	
	<b>4Z</b>	2	16SrV-C		PAW	X	
	<b>5Z</b>	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	<b>6Z</b>	0	NEG.		PAW		X
	<b>7Z</b>	0	NEG.		PAW		X

---

15	1Y	2	16SrV-C		PAW	X	
	2Y	0	NEG.		PAW		X
	3Y	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	4Y	2	16SrV-C		PAW	X	
	5Y	0	NEG.		PAW		X
	6Y	1		SINTOMATICA	PAW	X	

---

**Tabella 3A.** Piante selezionate nell'annata 2014 in relazione all'analisi PCR e alla sintomatologia espressa e trattate nel biennio 2015-2016. In rosso: piante infette trattate con PAW; in arancione: piante sane trattate con PAW; in blu: piante malate trattate con H<sub>2</sub>O; in azzurro: piante sane trattate con H<sub>2</sub>O.

Vigneto	Vite	Gravità Sintomi	Selezionate in relazione a:		Tesi	Studio dell'effetto:	
			PCR	sintomi		"curativo"	"preventivo"
5	<b>1L</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>2L</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>3L</b>	3	16SrV		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>4L</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5L</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>6L</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>7L</b>	0		NON SINT.	PAW		X
6	<b>1N</b>	3	16SrV-C		PAW	X	
	<b>2N</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>3N</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>4N</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5N</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>6N</b>	0	NEG.		H <sub>2</sub> O		X
	<b>7N</b>	0		NON SINT.	PAW		X
7	<b>1M</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>2M</b>	3	16SrI		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>3M</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>4M</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5M</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>6M</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>7M</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
8	<b>2Q</b>	3	16SrX		PAW	X	
	<b>4Q</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5Q</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>6Q</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
9	<b>1J</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>2J</b>	3	16SrI		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>3J</b>	4	16SrV-D		PAW	X	
	<b>4J</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5J</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>6J</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>7J</b>	0		NON SINT.	PAW		X
	<b>8J</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	
10	<b>1K</b>	3	16SrV		PAW	X	
	<b>2K</b>	1	16SrV		H <sub>2</sub> O	X	
	<b>3K</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>4K</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>5K</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>6K</b>	3		SINTOMATICA	PAW	X	
	<b>7K</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X	

12	<b>BR1</b>	2	16SrXII-A		PAW	X
	<b>BR2</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X
	<b>BR3</b>	2	16SrI		PAW	X
	<b>BR4</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X
	<b>BR5</b>	2	16SrI		PAW	X
	<b>BR6</b>	2		SINTOMATICA	PAW	X

**Tabella 4A.** Piante selezionate nell'annata 2016 in relazione all'analisi PCR e alla sintomatologia espressa e trattate nel biennio 2017-2018. In rosso: piante infette trattate con PAW; in arancione: piante sane trattate con PAW; in blu: piante malate trattate con H<sub>2</sub>O; in azzurro: piante sane trattate con H<sub>2</sub>O.

## Appendice 7.

### Risultati della prova di campo

Vigneto	Vite	Tesi	Anno 0		1° anno post trattamento		2° anno post trattamento	
			gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR	gravità sint.	PCR
14	<b>1C</b>	PAW	5	16SrXII-A	4	NEG.	4.5	16SrVII-A
	<b>2C</b>	H <sub>2</sub> O	5	16SrXII-A	5	NEG.	4.5	16SrXII-A
	<b>3C</b>	PAW	2	16SrV-C	2	16SrV-C	5	16SrV-C
	<b>4C</b>	PAW	3	16SrV-D	3	NEG.	5	16SrI
	<b>5C</b>	H <sub>2</sub> O	5	16SrXII-A	5	16SrXII-A	5	16SrI
	<b>6C</b>	PAW	0	NEG.	1	NEG.	1	16SrVII-A
	<b>7C</b>	PAW	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>8C</b>	H <sub>2</sub> O	3	16SrV-C	3	16SrV-C	MORTA	/
	<b>9C</b>	PAW	3	16SrXII-A	3	16SrXII-A	2	16SrVII-A
	<b>10C</b>	PAW	0	16SrX	0	NEG.	0	NEG.
	<b>11C</b>	PAW	3	16SrV-C	3	16SrV-C	5	16SrV-C
	<b>12C</b>	PAW	4	16SrXII-A	4	16SrXII-A	5	16SrXII-A
	<b>13C</b>	PAW	4	16SrV-C	4	16SrV-C	MORTA	/
	<b>14C</b>	PAW	4	16SrV-C	5	16SrV-C	MORTA	/
13	<b>1B</b>	H <sub>2</sub> O	1	16SrI	1	16SrV	2	16SrV-C
	<b>2B</b>	PAW	1	16SrV-C	0	NEG.	0	NEG.
	<b>3B</b>	PAW	2	16SrV-D	1	16SrV-C	1.5	16SrV
	<b>4B</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	16SrXII-A	1	16SrI
	<b>5B</b>	PAW	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>6B</b>	PAW	0	NEG.	3.5	NEG.	3.5	NEG.
	<b>7B</b>	H <sub>2</sub> O	3	SINT.	3	16SrX	3.5	16SrI
	<b>8B</b>	PAW	3	SINT.	3	16SrV	3	16SrV
	<b>9B</b>	PAW	2	SINT.	2	16SrVI	3	16SrI
	<b>10B</b>	H <sub>2</sub> O	3	SINT.	3	16SrV	0	16SrI
	<b>11B</b>	PAW	0	NO SINT.	0	16SrVII-A	0	16SrI
	<b>12B</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	2	NEG.
	<b>13B</b>	PAW	0	NO SINT.	0	16SrVII-A	0	NEG.
17	<b>1E</b>	PAW	5	16SrV-A	5	16SrV-C	3	NEG.
	<b>2E</b>	PAW	4	NEG.	3.5	NEG.	3	16SrV

	<b>3E</b>	H <sub>2</sub> O	3	NEG.	2.5	16SrV-C	3	16SrV-C
	<b>4E</b>	PAW	2	SINT.	2	16SrV	2	16SrV
16	<b>1A</b>	PAW	4	16SrV-C	3.5	NEG.	1	NEG.
	<b>2A</b>	H <sub>2</sub> O	4	16SrV-C	2.5	NEG.	1	16SrVII-A
	<b>3A</b>	PAW	3	16SrXII-A	0	NEG.	0	NEG.
	<b>4A</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	2	NEG.	1	16SrV
	<b>5A</b>	PAW	0	NEG.	5	NEG.	1	NEG.
	<b>6A</b>	PAW	0	NEG.	2.5	NEG.	0	NEG.
	<b>7A</b>	PAW	0	NO SINT.	1	16SrV	0	NEG.
	<b>8A</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>9A</b>	PAW	3	SINT.	1	16SrI	1	16SrI
	<b>10A</b>	PAW	4	SINT.	2	16SrV	3	16SrV-C
	<b>11A</b>	PAW	4	SINT.	0	NEG.	1	NEG.
	<b>12A</b>	PAW	3	SINT.	2	?	MORTA	/
	<b>13A</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>14A</b>	PAW	0	NO SINT.	4	16SrV	4	16SrV
	<b>15A</b>	H <sub>2</sub> O	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
11	<b>1Z</b>	H <sub>2</sub> O	2	16SrV-C	0	16SrV	1	NEG.
	<b>2Z</b>	PAW	1.5	16SrV-C	1.5	NEG.	0	NEG.
	<b>3Z</b>	PAW	1	16SrI	0	16SrVI	0	NEG.
	<b>4Z</b>	PAW	2	16SrV-C	1	16SrV-C	0	16SrX
	<b>5Z</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	NEG.	0.5	NEG.
	<b>6Z</b>	PAW	0	NEG.	0	16SrXII-A	0	NEG.
	<b>7Z</b>	PAW	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.
15	<b>1Y</b>	PAW	2	16SrV-C	1	NEG.	0	16SrI
	<b>2Y</b>	PAW	0	NEG.	0	16SrVII-A	0	16SrI
	<b>3Y</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	16SrVII-A	0	NEG.
	<b>4Y</b>	PAW	2	16SrV-C	1	NEG.	0	16SrI
	<b>5Y</b>	PAW	0	NEG.	1	NEG.	5	16SrV-D
	<b>6Y</b>	PAW	1	SINT.	1	16SrV-C	0	NEG.
2	<b>1D</b>	PAW	1	SINT.	0	NEG.	0	16SrXII-A
	<b>2D</b>	PAW	0	16SrX	0	16SrX	0	16SrX
	<b>3D</b>	PAW	0	NO SINT.	0	16SrVII-A	0	NEG.
	<b>4D</b>	H <sub>2</sub> O	4	16SrV-A	2	16SrV-A	2	NEG.
1	<b>5D</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrI
	<b>6D</b>	PAW	4	16SrV	4	16SrV-C	MORTA	/
	<b>7D</b>	PAW	4	16SrV	/	/	MORTA	/
	<b>8D</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	NEG.	0	16SrVII-A
	<b>9D</b>	PAW	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>10D</b>	PAW	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.
3	<b>1H</b>	PAW	1	16SrI	0	16SrI	0	16SrXII-A
	<b>2H</b>	PAW	1	SINT.	0	NEG.	0	NEG.
	<b>3H</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrI
	<b>4H</b>	PAW	2.5	16SrV	3	16SrV	2	16SrI
	<b>5H</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrI
	<b>6H</b>	H <sub>2</sub> O	1	SINT.	0	16SrXII-A	0	16SrI
	<b>7H</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrI
	<b>8H</b>	H <sub>2</sub> O	1	16SrI	0	16SrI	0	16SrXII-A
4	<b>1F</b>	PAW	2	SINT.	0	NEG.	0	16SrI
	<b>2F</b>	PAW	1	16SrI	0	NEG.	0	NEG.
	<b>3F</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrVI
	<b>4F</b>	PAW	1	SINT.	0	NEG.	0	16SrXII-A
	<b>5F</b>	PAW	1	16SrI	0	16SrI	0	16SrX
	<b>6F</b>	PAW	0	NEG.	0	NEG.	0	16SrXII-A
	<b>7F</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	NEG.	0	NEG.

	<b>8F</b>	H <sub>2</sub> O	1	16SrI	0	16SrI	0	16SrXII-A
5	<b>1L</b>	PAW	3	16SrV	0	16SrI	0	16SrVII-A
	<b>2L</b>	PAW	3	16SrV	0	NEG.	0	NEG.
	<b>3L</b>	H <sub>2</sub> O	3	16SrV	0	NEG.	0	16SrVII-A
	<b>4L</b>	PAW	3	SINT.	4	16SrXII-A	0	NEG.
	<b>5L</b>	PAW	3	SINT.	0	16SrI	0	NEG.
	<b>6L</b>	PAW	3	SINT.	3	NEG.	0	NEG.
	<b>7L</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	NEG.
6	<b>1N</b>	PAW	3	16SrV-C	4	NEG.	3	16SrI
	<b>2N</b>	PAW	3	16SrV	0	16SrXII-A	3	16SrI
	<b>3N</b>	PAW	3	16SrV	4.5	16SrVII-A	2	16SrI
	<b>4N</b>	PAW	3	SINT.	0	16SrI	3	16SrVII-A
	<b>5N</b>	PAW	3	SINT.	0	NEG.	1	16SrI
	<b>6N</b>	H <sub>2</sub> O	0	NEG.	0	16SrXII-A	1	16SrXII-A
	<b>7N</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	2	16SrI
7	<b>1M</b>	PAW	3	16SrV	1	16SrVII-A	0	16SrVII-A
	<b>2M</b>	H <sub>2</sub> O	3	16SrI	1	16SrI	0	16SrI
	<b>3M</b>	PAW	3	16SrV	1	NEG.	0	16SrVII-A
	<b>4M</b>	PAW	3	SINT.	1	16SrI	0	NEG.
	<b>5M</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrI	0	16SrI
	<b>6M</b>	PAW	0	NO SINT.	1	NEG.	0	NEG.
	<b>7M</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrXII-A	0	NEG.
8	<b>2Q</b>	PAW	3	16SrX	0	16SrXII-A	0	NEG.
	<b>4Q</b>	PAW	2	SINT.	0	16SrXII-A	0	NEG.
	<b>5Q</b>	PAW	0	NO SINT.	0	NEG.	0	16SrVII-A
	<b>6Q</b>	PAW	2	SINT.	0	16SrI	0	NEG.
9	<b>1J</b>	PAW	3	16SrV	1	16SrI	0	NEG.
	<b>2J</b>	H <sub>2</sub> O	3	16SrI	1	16SrI	5	16SrI
	<b>3J</b>	PAW	4	16SrV-D	1	/	MORTA	/
	<b>4J</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrXII-A	0	NEG.
	<b>5J</b>	PAW	2	SINT.	1	NEG.	0	NEG.
	<b>6J</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrI	0	NEG.
	<b>7J</b>	PAW	0	NO SINT.	1	NEG.	1	NEG.
	<b>8J</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrI	0	16SrVII-A
10	<b>1K</b>	PAW	3	16SrV	1	16SrV	2	16SrX
	<b>2K</b>	H <sub>2</sub> O	1	16SrV	1	16SrV	2	16SrV
	<b>3K</b>	PAW	3	SINT.	1	NEG.	0	16SrI
	<b>4K</b>	PAW	3	SINT.	1	/	MORTA	/
	<b>5K</b>	PAW	3	SINT.	1	16SrI	0	NEG.
	<b>6K</b>	PAW	3	SINT.	1	16SrXII-A	0	16SrVII-A
	<b>7K</b>	PAW	2	SINT.	3	16SrXII-A	2	16SrI
12	<b>BR1</b>	PAW	2	16SrXII-A	1	16SrXII-A	0	16SrI
	<b>BR2</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrI	0	16SrI
	<b>BR3</b>	PAW	2	16SrI	1	16SrXII-A	0	16SrXII-A
	<b>BR4</b>	PAW	2	SINT.	1	NEG.	0	16SrXII-A
	<b>BR5</b>	PAW	2	16SrI	1	16SrI	0	16SrI
	<b>BR6</b>	PAW	2	SINT.	1	16SrXII-A	0	16SrXII-A

**Tabella 5A.** Effetto del trattamento biennale con PAW in piante infette e esenti da fitoplasmosi. La tabella, per ogni anno di sperimentazione, evidenzia la gravità dei sintomi riscontrata per ciascun campione e i risultati dell'analisi PCR. In rosso: piante infette trattate con PAW; in arancione: piante sane trattate con PAW; in blu: piante malate trattate con H<sub>2</sub>O; in azzurro: piante sane trattate con H<sub>2</sub>O.

## Publicazioni

- Contaldo N., Satta E., **Zambon Y.**, Paltrinieri S., Bertaccini A., 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods* 127, 105-110.
- Zambon Y.**, Contaldo N., Canel A., Laurita R., Gherardi M., Colombo V., Bertaccini A., 2017. Plasma atmosferico freddo: energia per una viticoltura eco-sostenibile. *Conegliano Valdobbiadene* (4), 79-82
- Zambon Y.**, Canel A., Bertaccini A., Contaldo N., 2018. Molecular diversity of phytoplasmas associated with yellows disease in north-eastern Italy. *Phytopathology* 108(2), 206-214.
- Zambon Y.**, Contaldo N., Canel A., Laurita R., Gherardi M., Colombo V., Bertaccini A., 2018. Controllo e sostenibilità dei giallumi della vite con il plasma. *Vite & Vino* 02, 66-71.

## Partecipazione a congressi

(sottolineati quelli come relatore)

- Contaldo N., **Zambon Y.**, Paltrinieri S., Mori N., Mitrovic J., Duduk B., Bertaccini A., 2016. Characterization of '*Candidatus* Phytoplasma solani' strains from grapevines, *Hyalesthes obsoletus*, reference strains in periwinkle and in colonies. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Bois Noir workshop*, Klosterneuburg, Austria, Marzo 9-11, 66, 63-69.
- Bertaccini A., Biondi E., Canel A., Colombo V., Contaldo N., Gherardi M., Laurita R., Perez S., Stancampiano A., **Zambon Y.**, 2016. Plasma activated water (PAW) for tomato plants and grapevine disease management. *Workshop on application of advanced plasma technologies in CE agriculture*, Lubiana, Slovenia, Aprile 19-20.
- Bertaccini A., Canel A., Colombo V., Contaldo N., Gherardi M., Laurita R., Stancampiano A., **Zambon Y.**, 2016. Plasma activated water (PAW) for grapevine yellows disease management. *6th international conference on plasma medicine (ICPM-6)*, Bratislava, Slovak, September 4-9, 137.
- Bertaccini A., Biondi E., Canel A., Colombo V., Contaldo N., Gherardi M., Laurita R., Perez S., Stancampiano A., **Zambon Y.**, 2017. Plasma activated water (PAW) for treatment of plants disease. *XXIII International symposium on plasma chemistry*, Montreal, Canada, 30/7 - 4/8, 889-891.
- Zambon Y.**, Laurita R., Contaldo N., Gherardi M., Colombo V., Bertaccini A., 2017. Plasma activated water (PAW) effects in phytoplasma disease. *VII incontro nazionale sui fitoplasmi e le malattie da fitoplasmi*, Torino, Italia, Settembre 11-13, 28.
- Contaldo N., D'Amico G., **Zambon Y.**, Bertaccini A., 2017. Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di fitoplasmi. *VII incontro nazionale sui fitoplasmi e le malattie da fitoplasmi*, Torino, Italia, Settembre 11-13, 37.

**Zambon Y.**, Marchetti D., Canel A., Bertaccini A., Contaldo N., 2018. New insights on grapevine yellows disease in north-eastern Italy. *19<sup>th</sup> Conference of the international council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine*, Santiago, Cile, Aprile 9-12, 102-103.

Bertaccini A., Biondi E., Canel A., Colombo V., Contaldo N., Gherardi M., Laurita R., Perez S., Stancampiano A., **Zambon Y.**, 2018. Use of the plasma activated water as plant defense enhancer. *7th International conference on plasma medicine*, Philadelphia, USA, June 17-22.

**Zambon Y.**, Contaldo N., Laurita R., Canel A., Gherardi M., Colombo V., Bertaccini A., 2018. *Transcriptional profiling of phytoplasma infected plants treated with plasma activated water (PAW)*. *22th Congress of the International organization for mycoplasmaology*, Portsmouth, USA, July 9-12, 57.

Contaldo N., D'Amico G., **Zambon Y.**, Bertaccini A., 2018. '*Candidatus* Phytoplasma asteris' isolated from grapevine: preliminary metabolic features. *22<sup>th</sup> Congress of the International organization for mycoplasmaology*, Portsmouth, USA, July 9-12, 54.

### **Attività di ricerca presso istituti stranieri**

Dal 15/11/2017 al 23/02/2018 [borsa Marco Polo] presso il centro di ricerca NAIK (National Agricultural Research and Innovation Center) Gödöllő (Ungheria) sotto la supervisione della dottoressa Éva Várallyay.

### **Altre attività**

- Correlatore della tesi di Laurea magistrale in Scienze e tecnologie Agrarie presso l'*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna dello studente Diego Marchetti intitolata: Epidemiologia dei giallumi della vite in provincia di Treviso. A.A. 2016/2017.

- Partecipazione al progetto "Strategie di controllo integrato per il contenimento di *Xylella fastidiosa* in oliveti pugliesi ed analisi epidemiologica del "complesso del disseccamento rapido dell'olivo" (CoDiRO) mediante sopralluoghi e campionamenti di materiale vegetale infetto presente nelle aree di diffusione della malattia e successiva analisi diagnostica di laboratorio.

- Partecipazione al progetto H2020 No. 727459 "Insect-borne prokaryote-associated diseases in tropical and subtropical perennial crops (Tropicsafe)" per il collezionamento e l'analisi di materiale di vite infetto da fitoplasmi.

## *Ringraziamenti*

Ringrazio il professor ing. Vittorio Colombo e tutto il suo gruppo di ricerca del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Bologna per aver prodotto e fornito l'acqua attivata al plasma. Ringrazio particolarmente il dott. ing. Romolo Laurita per essersi reso sempre disponibile nel produrre grandi quantità di PAW necessarie per i numerosi esperimenti condotti.

Ringrazio la prof.ssa Assunta Bertaccini per avermi concesso l'opportunità di svolgere questo periodo di ricerca nel suo gruppo di lavoro; la dott.ssa Nicoletta Contaldo per avermi affiancato passo passo in questo cammino e soprattutto per aver creduto nel progetto e nelle mie reali potenzialità. Le dott.sse Samanta Paltrinieri e Eleonora Satta per essersi rese sempre disponibili e per aver condiviso giornalmente con me la routine lavorativa.

Ringrazio il dott. Alessandro Canel (Vinsandro) per l'amicizia sincera ed in particolar modo per aver creduto sempre e comunque in questo progetto dedicando passione, tempo e denaro senza pensare a possibili risvolti economici.

Ringrazio l'agronomo Nicola Pretotto e la Cantina Colli del Soligo per la collaborazione ed il supporto economico per la sperimentazione di campo.

Ringrazio la dott.ssa Paola De Sanctis del DIMES Università di Bologna per l'aiuto nella progettazione e validazione dei "primers" utilizzati in qRT-PCR; il prof. Stefano Tartarini e la dott.ssa Federica Savazzini per avere gentilmente messo a disposizione alcune delle strumentazioni necessarie alla sperimentazione condotta; il prof. Luca Dondini per la disponibilità nel discutere i risultati ottenuti; la prof.ssa Ilaria Filippetti e la dott.ssa Chiara Pastore per l'aiuto negli esperimenti di espressione genica in vite.

Ringrazio infine di vero cuore la dott.ssa Éva Várallyay per avermi ospitato presso il centro di ricerca NAIK, per aver finanziato il progetto inerente lo studio di miRNAs e per avermi fatto crescere come ricercatore e persona.