





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2012-VI



## RIPRODUZIONE DELLE PIANTE E PRODUTTIVITÀ AGRICOLA

Firenze, 30 marzo 2012



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2013  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2012 - Serie VIII - Vol. 9 (188° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-1291-9

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| MAURO CRESTI<br><i>Introduzione</i>  | 7  |
| LUCA DONDINI, PAOLO DE FRANCESCHI, SILVIERO SANSAVINI<br><i>L'incompatibilità nelle piante da frutto: i meccanismi di rigetto</i>  | 9  |
| GIAMPIERO CAI, STEFANO DEL DUCA,<br>DONATELLA SERAFINI-FRACASSINI, MAURO CRESTI<br><i>Deposizione della parete e citoscheletro,<br/>crescita del tubetto pollinico e successo riproduttivo</i> | 23 |
| LUCIA COLOMBO, MARTA ADELINA MENDES, BEATRICE CASTELNOVO<br><i>Controllo molecolare dello sviluppo dell'ovulo</i>  | 45 |
| LUIGI PARROTTA, GIAMPIERO CAI, MAURO CRESTI<br><i>Espressione differenziale di alfa e beta tubulina<br/>come marker dello sviluppo in Vitis vinifera L.</i>                                    | 55 |
| EMIDIO ALBERTINI<br><i>Apomissia: storia di un carattere rivoluzionario</i>  | 77 |
| DOMENICO CARPUTO<br><i>Gameti non ridotti: citologia e uso nel miglioramento genetico vegetale</i>   | 95 |

GIANNI BARCACCIA

*Maschiosterilità ed eterosi nelle varietà ibride:  
dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica*

107

MAURO CRESTI

*Conclusioni*

133

#### NOTA DI REDAZIONE

Alla Giornata di studio ha contribuito con una relazione dal titolo “La genomica dell’olivo legata alla riproduzione” anche il prof. Rosario Muleo, della quale però il relatore non ha consegnato il testo per la stampa.

## Introduzione

La storia della scienza è una parte importante della storia della civiltà dell'uomo. Lo studio della riproduzione sessuale delle piante riflette il crescente interesse delle necessità dell'uomo soprattutto riferita alla produzione di cibo di origine vegetale. Recentemente si è coniato il termine "Agrifood" riferito in particolare a produzioni vegetali di più o meno alta qualità che abbondano nei nostri territori tanto da rappresentare una quota importante del prodotto interno lordo (PIL); è quindi un settore che crea ricchezza e occupazione. Le produzioni di eccellenza dell'agrifood hanno come base le conoscenze sulla riproduzione sessuata delle piante che anche nell'antichità è stata studiata da valorosissimi scienziati (per una rassegna vedi CRESTI e LINSKENS, «Acta Botanica Cracoviensia», 1999, 41, pp. 18-29). Sin dall'antichità infatti anche le ricerche sulla sessualità delle piante hanno gradualmente seguito l'evolversi delle tecnologie che hanno portato all'applicazione di moderne metodologie (biologia generale e molecolare, genetica generale e molecolare, genomica, proteomica metabolomica e recentemente anche la robotica). Passo dopo passo i risultati conseguiti hanno permesso di ottenere importantissimi risultati applicativi che vanno nella direzione dell'aumento delle produzioni agricole, tema quanto mai importante se riferito all'aumento mondiale delle popolazioni e quindi delle necessità di cibo per l'uomo e al decremento delle superfici coltivate. Nel nostro Paese negli anni '90 è risultato di particolare interesse il programma finalizzato promosso dal CNR sulla "Biologia della riproduzione" che riguardò sia gli animali che le piante. Fu un programma importantissimo in quanto per la prima volta, in Italia, si svilupparono collaborazioni fra discipline di ricerca di base e applicata. In questi ultimi anni di

\* *Università di Siena*

particolare interesse sono stati gli studi, che in parte hanno riguardato anche la biologia riproduttiva, sul sequenziamento del genoma della vite. Questo progetto ha visto impegnati diverse istituzioni scientifiche italiane unite in un apposito consorzio e altre istituzioni scientifiche francesi a loro volta unite in un altro consorzio che unendosi hanno permesso di mettere insieme delle eccellenze al servizio di uno dei settori più qualificati dell'agricoltura italiana.

Da non sottovalutare che l'introduzione di moderne tecnologie e metodologie di investigazione hanno permesso di riaffrontare, con metodologie di avanguardia, il problema della gametogenesi femminile, tanto che era stata chiamata la "forgotten generation". Non molto infatti era stato fatto dopo la scoperta della "doppia fecondazione" a opera di Navashin e Guignard (vedi STANLEY e LINSKENS, *Pollen. Structure, biochemistry, application*, «Springer Verlag», 1974). Questo ha permesso, tra l'altro, di approfondire e capire un fenomeno importantissimo come l'apomissia che ha risvolti pratici rilevanti e probabilmente ancora potenzialmente non del tutto sfruttati.

Questa giornata di studio sulla "Riproduzione sessuata delle piante a fiore e produttività agricola" è stata organizzata nell'ambito delle attività promesse dal Comitato consultivo per la biologia agraria dell'Accademia dei Georgofili allo scopo di fare il punto su alcuni aspetti biologici e applicativi della riproduzione sessuata delle piante. Naturalmente non era assolutamente pensabile affrontare in una mattinata tutte le problematiche legate al tema della riunione scientifica; il comitato si è riservato di organizzare prossimamente altri eventi su temi magari più focalizzati e di interesse ancora più generale per il settore. In ogni caso le relazioni di questo incontro hanno riguardato aspetti biologici, genetici, molecolari e fisiologici, i processi legati alle modalità riproduttive di specie erbacee e arboree sia di piante modello, ma soprattutto di grande interesse agrario. Non sono mancati quindi importanti riferimenti a colture come quella della vite e dell'olivo, attraverso analisi di varie aree scientifiche che vanno dall'identificazione di marker dello sviluppo sino alla genomica indirizzata agli aspetti specifici della riproduzione. Particolare risalto hanno avuto argomenti legati al miglioramento genetico dei vegetali con tecnologie anche diverse da quelle dell'ingegneria genetica.



## L'incompatibilità nelle piante da frutto: i meccanismi di rigetto

L'INCOMPATIBILITÀ GAMETOFITICA NELLE ROSACEE: GENERALITÀ SUL LOCUS S  
E SUI MECCANISMI DI RIGETTO DEL POLLINE

La maggior parte delle specie appartenenti alle Angiosperme produce sia gli organi maschili e sia quelli femminili sullo stesso fiore, ma l'evoluzione ha favorito lo sviluppo di barriere genetiche allo scopo di evitare auto-fertilizzazione o la fecondazione tra individui geneticamente molto simili. Darwin parla dello sviluppo di queste strategie riproduttive come di uno dei fattori chiave del successo delle angiosperme e nel 1877 asseriva che «la natura detesta l'auto-fecondazione». L'auto-incompatibilità gametofitica (GSI) mediata da ribonucleasi è il meccanismo che impedisce l'autofecondazione nelle specie appartenenti alla famiglia delle Rosacee (cioè pomacee e drupacee). Tra queste specie questo meccanismo di riconoscimento dipende da un singolo locus (denominato locus S) in cui sono presenti almeno due geni: una ribonucleasi (RNasi S, determinante stilare) e un gene che codifica per proteine contenenti un dominio F-box (S-Fbox, determinante pollinico). Con il termine di “allele S” si indica normalmente ogni variante del locus S il quale però è composto da più di un gene e di conseguenza sarebbe più corretto usare il termine “aplotipo S”. Nella pratica quotidiana comunque i due termini si usano come sinonimi. I termini “self” e “non-self” indicano invece rispettivamente l'identità genetica degli alleli S o meno fra polline e pistillo: il polline “self” (recante un allele S geneticamente identico a uno degli alleli S del pistillo) è respinto mentre quello “non-self” (geneticamente non correlato) è accettato per la fecondazione (fig. 1). Le RNasi S quali determinanti femminili nell'incompatibilità gametofitica delle Rosacee

\* *Università di Bologna*

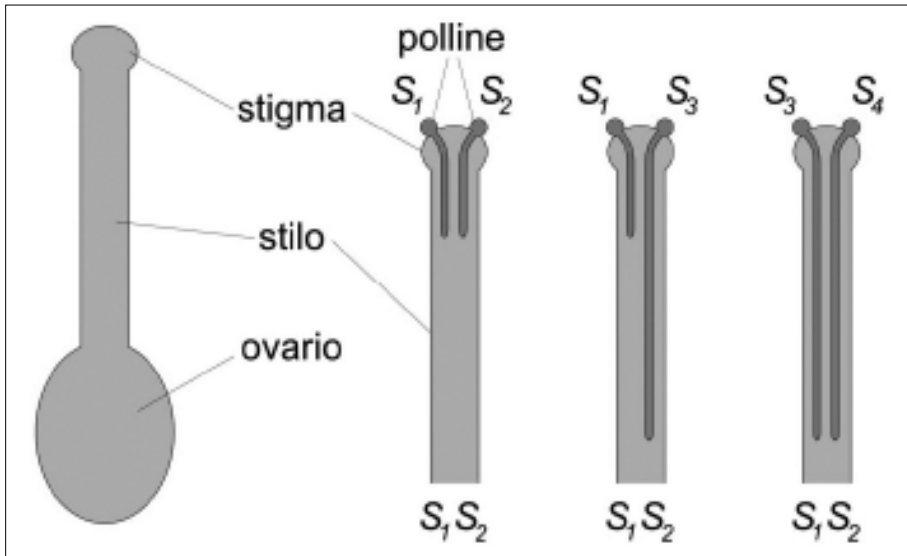


Fig. 1 Schema delle tre possibili combinazioni di incrocio in specie auto-incompatibili: a sinistra 100% incompatibili, al centro 50% compatibili, a destra 100% compatibile (De Franceschi et al., 2011)

sono note da moltissimi anni (sin da Sassa et al., 1992). Per quanto riguarda la natura del determinante maschile, solo recentemente sono stati identificati alcuni geni espressi in modo specifico nel polline codificanti per proteine contenenti un dominio F-box (Entami et al., 2003; Ushijima et al., 2003; Yamane et al., 2003; Sassa et al., 2007; Tao e Iezzoni, 2010; De Franceschi et al., 2011a; De Franceschi et al., 2011b; De Franceschi et al., 2011c). Il rigetto del polline avviene attraverso un meccanismo di degradazione proteica che viene innescato dal riconoscimento alplotipo-specifico delle RNasi S (fig. 2): nei tubetti “non-self” una variante allelica di una proteina Fbox riconosce specificamente una RNasi S e ne determina la degradazione attraverso “ubiquitinazione” (Zhang et al., 2010). Al contrario un tubetto “self” non sarebbe in grado di inibire l’attività citotossica delle RNasi S le quali sarebbero libere di degradare tutti gli RNA messaggeri del tubetto pollinico in allungamento causandone il rigetto. Questo meccanismo richiede l’attività proteolitica di numerosi geni che non appartengono al locus S, per esempio, un SLF-interacting SKP1-like (SSK), una subunità di cullina, un RING-BOX1 (RBX1) e un E2 ubiquitin-binding protein (Zhang et al., 2010). Tra gli altri geni che sono esterni al S-locus, ma che sono coinvolti in questo meccanismo bisogna ricordare la Transglutaminasi (TGasi), un enzima calcio-dipendente che durante la crescita dei tubetti

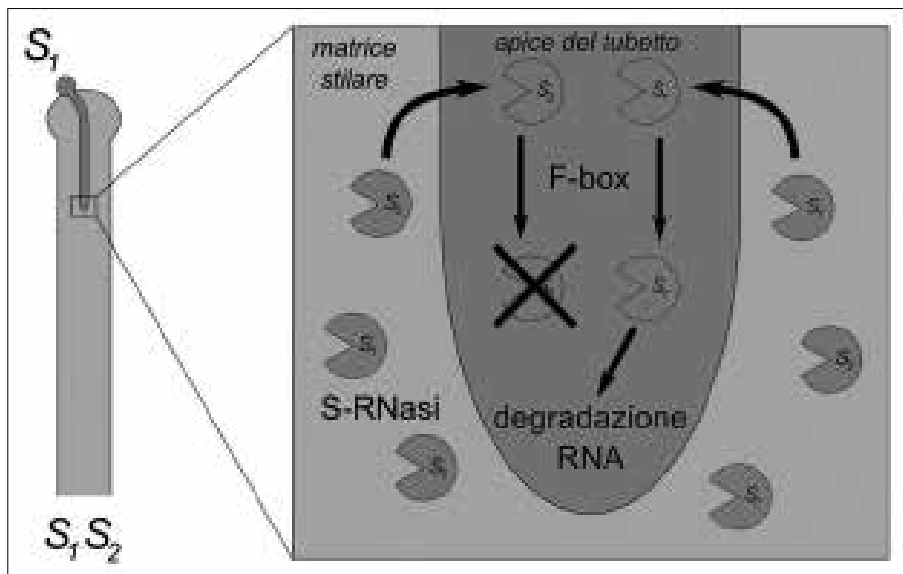


Fig. 2 Rigtto del polline recante l'allele  $S_1$  in un pistillo  $S_1/S_2$ . Le RNasi  $S$  sono importate in modo aspecifico all'interno del tubetto pollinico dalla matrice stilare. La RNasi  $S_2$  è inattivata dalle proteine F-Box espresse dal polline  $S_1$ , il quale non è però in grado di degradare le RNasi  $S_1$ . Quindi la RNasi  $S_1$  degraderà gli mRNA del polline provocandone il rigetto (da De Franceschi et al., 2011)

pollinici è coinvolto nella polimerizzazione di actina e nella formazione del citoscheletro. A oggi non è ancora stato chiarito come l'attività di tutti questi geni sia coordinata dal meccanismo di riconoscimento dei determinanti pollinici e stilari. In *Pyrus pyrifolia* (il pero giapponese) è noto che le RNasi  $S$  nelle combinazioni di incrocio incompatibili sono in grado di indurre alterazioni a carico del citoscheletro. Nelle Papaveraceae un fenomeno simile si evolve in una forma di morte cellulare programmata (PCD) (Thomas et al., 2006). Tuttavia non è ancora stato chiarito se le RNasi  $S$  stesse possono essere considerate degli iniziatori di programmi di morte cellulare programmata che si estrinsecano nel rigetto del polline negli incroci incompatibili nelle specie appartenenti alle Rosacee. Questa ricerca avrà delle importantissime ricadute applicative in specie di grande interesse economico quali quelle appartenenti alle pomacee (melo e pero) e drupacee (fra le quali ciliegio, albicocco e mandorlo) in cui il successo della fecondazione è basilare per l'allegagione e lo sviluppo del frutto. Le conoscenze dei vari aspetti relativi al funzionamento e al controllo genetico di questo fenomeno favoriranno nel prossimo futuro la selezione e l'affermazione di nuove varietà autofertili come sta già avvenendo in ciliegio, mandorlo e albicocco.

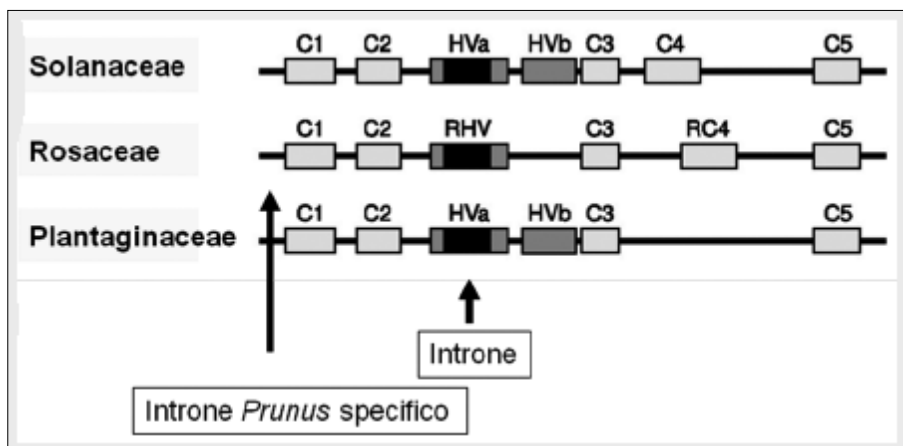


Fig. 3 Struttura del gene per l'RNasi S. C rappresenta i domini conservati (in grigio); HV indica i domini ipervariabili (in bianco); RC indica il dominio conservato numero 4 delle Rosacee (modificato da Tao e Iezzoni, 2010)

#### STRUTTURA E FUNZIONE DEL DETERMINANTE STILARE S RNASI

Analogamente a quanto descritto in altre specie, le RNasi S sono glicoproteine che svolgono la funzione di determinante stilare nell'incompatibilità gametofitica sia nelle Pyrinae sia nelle Prunoideae (Broothaerts et al., 1995; Sassa et al., 1996; Tao et al., 1997; Zuccherelli et al., 2002). Questi geni sono stati molto ben caratterizzati in tutte le specie appartenenti al Rosaceae e centinaia di sequenze geniche sono oggi a disposizione della comunità scientifica nelle banche dati.

La struttura genica delle RNasi S delle Rosaceae prevede la presenza di cinque regioni conservate (da C1 a C5), il quarto dominio (RC4) è presente nelle Rosacee in una posizione diversa rispetto a quanto osservato nelle Solanaceae e nelle Plantaginaceae, e vi è la presenza di una sola regione ipervariabile (RHV) (fig. 3). I domini conservati sono molto importanti per la specificità di azione di questo enzima mentre la regione ipervariabile sembra essere fortemente coinvolta nel riconoscimento "self" / "non-self" (Tao e Iezzoni, 2010). In tutte le RNasi caratterizzate nelle specie appartenenti alle Rosacee è presente un introne che si trova all'interno della regione ipervariabile mentre, ma solo nel genere *Prunus*, un ulteriore introne si trova tra il peptide segnale e il codone di inizio della proteina (Igc e Kohn, 2001).

Come già accennato, le RNasi S svolgono un ruolo citotossico che, in incroci incompatibili, è responsabile per il rigetto polline nel terzo superiore dello stilo. Al contrario, l'inattivazione dell'attività RNasica negli incroci compatibili è il requisito fondamentale per la crescita dei tubetti pollinici nella matrice stilare e per la successiva fecondazione dell'ovulo nell'ovario.

| ♂/♀              | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> |
|------------------|----------------|----------------|
| S <sub>101</sub> | 47%            | 52%            |
| S <sub>111</sub> | 1%             | 0%             |

Tab. 1 Segregazione degli alleli S in una progenie di pero derivata dell'incrocio Hayatama (S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>) x Wilder (S<sub>101</sub>S<sub>111</sub>)

La presenza di introni all'interno della struttura genica delle RNasi S (con dimensioni altamente variabili tra i diversi alleli S) è stata fondamentale per sviluppare protocolli di PCR per S-genotyping (la genotipizzazione degli alleli S). Questo strumento è il supporto più potente per programmi di selezione volti a definire i gruppi inter-fertilità tra le varietà appartenenti a specie in cui l'auto-incompatibilità è predominante (Zuccherelli et al., 2002; Sanzol e Herrero, 2002; Sutherland et al., 2004; Zisovith et al., 2004; Halasz et al., 2005; Goldway et al., 2009).

L'attività di S-genotyping ha fatto emergere anche elementi di criticità in un modello che, sulla base degli schemi di riconoscimento degli S alleli, prevede percentuali di compatibilità negli incroci molto precise. Infatti teoricamente la percentuale di compatibilità in incroci tra varietà con alleli 2, 1 o 0 in comune dovrebbe essere rispettivamente 0%, 50% e 100%. Queste percentuali nella pratica non sono mai così definite e, in alcuni casi, sono state descritte percentuali inusuali: i) occasionalmente si può avere produzione di frutta in incroci incompatibili; ii) segregazioni distorte di S-alleli rispetto al 100% teorico in incroci totalmente compatibili. Un'alta omologia di sequenza fra due S-alleli presenti nei due parentali negli incroci controllati può influire sui relativi rapporti di segregazione nelle progenie? La varietà di pero giapponese Hayatama (S1-S2) e quella di pero europeo Wilder (S101-S111) presentano questa situazione relativamente agli alleli S1 e S111 che sono molto simili. Analizzando la segregazione degli alleli S nella popolazione derivata dall'incrocio Hayatama x Wilder si è osservato che S111 è presente in un solo semenzale su 77 individui della progenie mentre viene rigettato in tutti gli altri casi (tab. 1; De Franceschi et al., risultati non pubblicati).

Questo esempio apre una prospettiva nuova nella comprensione dei meccanismi di rigetto del polline negli incroci controllati, prospettiva di cui si dovrà tenere conto per determinare in modo ancora più efficace, i gruppi di inter-fertilità fra le varietà appartenenti a specie in cui l'autoincompatibilità è prevalente.

#### STRUTTURA E FUNZIONE DEL DETERMINANTE POLLINICO S FBOX

Analogamente a quanto riportato per le Solanaceae e Plantaginaceae, il de-

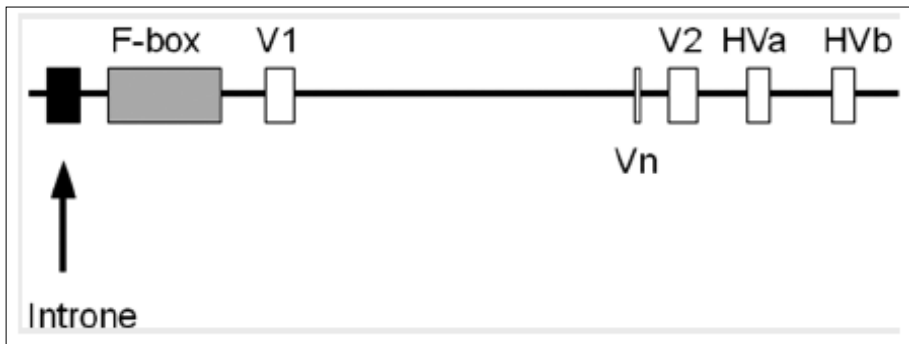


Fig. 4 Struttura delle proteine contenenti un dominio F-box (in grigio). V and HV (in bianco) indicano i domini variabili e ipervariabili (modificato da Tao e Iezzoni 2010)

terminante pollinico dell'auto-incompatibilità gametofitica mediata da ribonucleasi nelle Rosaceae è stato identificato diversi anni dopo il determinante stilare. Tale determinante è stato caratterizzato dapprima nelle Prunoidee (Entani et al., 2003; Yamane et al., 2003). Gli autori hanno chiamato questi geni del locus S F-box (SFB). In *Prunus* un singolo gene F-box determina la funzione pollinica (Tao e Iezzoni, 2010), mentre in melo, pero europeo e giapponese più geni S-locus F-box (denominati S-locus F-Box Brothers o SFBBs) sono stati recentemente identificati e descritti quali candidati per questa specificità: tutti questi geni sono espressi in modo specifico nel polline e sono strettamente associati alla RNasi S all'interno del locus S (Sassa et al., 2007; Minamikawa et al., 2010; De Franceschi et al., 2011a e 2011b).

Per quanto riguarda la struttura, SFB e SFBBs contengono un dominio F-Box, due regioni variabili (V1 e V2) e due iper-variabili (HVA e HVB; Ikeda et al., 2004) (fig. 4). Tali regioni sembrano essere coinvolte nel riconoscimento "self" / "non-self". I domini F-box sono diffusi in proteine che devono interagire con altri substrati proteici. In particolare erano già state descritte proteine con tali caratteristiche nei complessi per degradazione proteolitica attraverso il proteasoma 26S. Queste proteine dovrebbero interagire specificamente con le S-RNasi per inibire l'attività ribonucleasica e, di conseguenza, la citotossicità dell'enzima all'interno del tubetto pollinico "non-self" in incroci compatibili (il caso delle Pyrinae), o di interagire con le RNasi S e lasciarle attive nel polline "self" nel caso di incroci incompatibili (il caso delle Prunoidee) e bloccarne la crescita (Tao e Iezzoni, 2010; fig. 5).

Nella sottotribù delle Pyrinae il ruolo svolto dai molti geni SFBB all'interno del singolo S locus è ancora da chiarire. Tale struttura assomiglia molto a quella descritta in *Petunia*. In questo modello sperimentale è stato osservato



Fig. 5 *Interazione fra il determinante pollinico e stilare nelle Pyrinae e nel genere Prunus: nel primo caso l'interazione fra i due determinanti provoca l'inattivazione della RNasi S, nel secondo è elemento imprescindibile per il mantenimento della sua citotossicità (modificato da Tao e Iezzoni, 2010)*

che ogni gene SLF (così sono chiamati i geni S-FBox in questo modello) svolgeva il ruolo di determinante pollinico solo nei confronti di una o poche RNasi S, e che quindi la funzione pollinica nel suo complesso doveva essere svolta da un pool di molti geni. Questo nuovo modello di riconoscimento è stato per questo motivo definito “modello collaborativo di riconoscimento non-self”. Ogni RNasi S, una volta entrata in modo aspecifico nel tubetto, dovrà essere legata da una specifica proteina F-box perché sia ubiquitinata e successivamente degradata.

Perché questo sia possibile ogni apotipo S dovrà necessariamente possedere un numero di geni F-box sufficiente a riconoscere e degradare tutti gli alleli “non-self” della RNasi S, mentre dovrà essere privo dei geni deputati al riconoscimento della sola RNasi S “self”.

Questo modello sembra adattarsi molto bene al caso specifico delle Pyrinae ma l'evidenza sperimentale è ancora da produrre.

#### DALLO STUDIO DEI MUTANTI POLLINICI E STILARI AL SUPERAMENTO DELLE BARRIERE GENETICHE DELL'INCOMPATIBILITÀ

Una trattazione completa delle differenze osservate fra pomacee e drupacee per quanto riguarda la struttura e funzionalità del locus S deve tenere in considerazione il diverso comportamento dei mutanti che sono associati al superamento dell'autoincompatibilità. In *Prunus* sono noti da tempo mutanti dei geni che codificano per il determinante pollinico, mutanti nei quali inserzioni o delezioni di porzioni del gene risultano determinanti nel superamento

| SPECIE                  | DETERMINANTI STILARI | DETERMINANTI POLLINICI |
|-------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>Pyrus communis</i>   | S121°                | -                      |
| <i>Pyrus pyrifolia</i>  | S4 <sup>sm</sup>     | -                      |
| <i>Prunus avium</i>     | -                    | S3'; S4'               |
| <i>Prunus mume</i>      | -                    | S1', S3'               |
| <i>Prunus armeniaca</i> | -                    | Sc                     |
| <i>Prunus cerasus</i>   | -                    | S1', S13'              |

Tab. 2 Mutazioni note a carico dei determinanti stilari e pollinici

dell'incompatibilità (tab. 2, modificato da Tao e Iezzoni, 2010). In albicocco la mutazione dell'SFB nell'aplotipo Sc è ben nota da tempo (Vilanova et al., 2006), ma non sembra essere è l'unica fonte di compatibilità. Gareksheikbayat (2010) ha analizzato recentemente le varietà di Bora (autocompatibile grazie all'aplotipo Sc), Portici (autocompatibile, ma sprovvista dell'aplotipo Sc) e la varietà da esse derivata Maia (autocompatibile che non ha ricevuto l'allele Sc da Bora). 'Maia' e 'Portici' devono essere portatrici di una mutazione in grado di conferire loro autocompatibilità che non è stata ancora caratterizzata. Analoghi risultati sono stati descritti in ciliegio dolce a carico degli aplotipi S3 e S4, le cui mutazioni nel determinante pollinico hanno conferito alle varietà che ne sono in possesso autocompatibilità (Tao e Iezzoni, 2010). Se in *Prunus* la perdita della funzione pollinica conferisce autocompatibilità significa che in queste specie determinante il polline agisce proteggendo la RNasi S "self" da un inibitore generale, consentendo di esercitare la propria funzione citotossica. Contrariamente al *Prunus*, nelle pomacee i mutanti non funzionali della funzione pollinica associati ad auto-compatibilità non sono mai stati descritti. Nel pero sono invece noti mutanti del determinante stilare. Una delezione di una regione genomica di 236 kb nell'aplotipo S4-RNasi della varietà di pero giapponese Nijisseiki ha prodotto un aplotipo mutante S4<sup>sm</sup> che ha prodotto la varietà derivata autofertile Osa-Nijisseiki (Okada et al., 2008). Inoltre in pero europeo l'allele mutato S121 è stato identificato nelle due varietà autocompatibili Abugo e Ceremeño (Sanzol et al., 2009) (tab. 2). In questo caso un elemento TRIM è stato trovato nel introne della RNasi S, ma è ancora da dimostrare che questa sia la causa della perdita di funzionalità di questo allele il quale non è espresso negli stili dei due genotipi auto-compatibili (Sanzol et al., 2009).

In letteratura sono descritti diversi altri geni (che non sono localizzati nel locus S) i quali svolgono comunque una funzione nei meccanismi di rigetto del polline. Alcuni di questi geni, come già accennato sono coinvolti nell'attività del complesso SCF (SLF-interacting SKP1-like, cullina, RING-BOX1 e



| $\sigma^7/\phi$ | $S_1$ | $S_8$ |
|-----------------|-------|-------|
| $S_1$           | 42%   | 22%   |
| $S_8$           | 22%   | 36%   |

Tab. 3 *Segregazione di alleli S in una progenie di albicocco derivata dall'autoimpollinazione della varietà Katy ( $S_1S_8$ ) (modificato da Wu et al., 2010)*

E2 ubiquitin-binding protein), altri sono fondamentali per la crescita del tubetto pollinico quali la transglutaminasi (TGasi). Possono mutazioni a carico di questi geni esterni al locus S modificare i meccanismi di rigetto del polline “self” e diventare sorgenti di autofertilità?

In letteratura sono già descritti casi in cui questo fenomeno si è verificato. I report che descrivono la compatibilità auto derivata da mutazioni esterni al locus S sono già disponibili. In ciliegio dolce è noto il caso della varietà Cristobalina in cui la mutazione che ne conferisce autofertilità è localizzata nel LG 3 e non nel linkage group 6 in cui ha sede il locus S delle drupacee (Cachi et al., 2010). La varietà Katy di albicocco (la cui combinazione allelica al locus S è  $S_1$ - $S_8$ ) sembra avere un comportamento simile. Questa varietà viene fecondata sia dai pollini che trasportano il gene SFB1 sia da quelli recanti il gene SFB8 (tab. 3; Wu et al., 2010). In questo lavoro è chiaramente descritto che non sono state identificate alterazioni nei geni SFB1 e SFB8, quindi si esclude che l'autofertilità derivi dalla presenza dell'allele Sc. Analogamente a Cristobalina anche Katy dovrebbe possedere una mutazione a carico di un gene esterno al locus S.

La conoscenza del ruolo dei geni coinvolti nei meccanismi di rigetto del polline ha già permesso di sviluppare applicazioni nel campo dell'ingegneria genetica per la produzione di nuovi genotipi autofertili. La varietà di melo Elstar è stata geneticamente modificata mediante approccio di silenziamento genico a carico dell'S RNasi S3 e questa pianta GM è risultata, come atteso, autofertile (Broothaerts et al., 2004). Tale strategia potrà essere in futuro utilizzata anche su altre cultivar di melo e pero mentre nelle drupacee, per utilizzarla, bisognerà silenziare i geni S FBox.

## CONCLUSIONI

In questi ultimi anni la ricerca nel campo della biologia florale, e in particolare sui meccanismi di incompatibilità e rigetto del polline, ha prodotto numerose nuove scoperte che sono state determinanti per chiarire il ruolo di molti geni (sia quindi dei determinanti stilari e pollinici, sia degli altri geni esterni al locus S) che sono coinvolti in questo meccanismo.

Attraverso la genotipizzazione degli alleli S è stato inoltre finalmente possibile definire su base molecolare i gruppi di inter-fertilità in quattro specie: melo, pero, ciliegio e albicocco.

Sebbene tali geni siano stati ampiamente studiati e caratterizzati, la ricerca di base non ha ancora chiarito alcuni aspetti importanti quali il significato delle diverse strutture del locus S che si sono evolute nelle pomacee e nelle drupacee e la ragione per cui in alcune combinazioni di incrocio in queste specie gli alleli S non segregano seguendo le modalità attese. Tali informazioni avranno anche importanti ricadute applicative perché permetteranno una più precisa definizione dei gruppi di inter-fertilità fra varietà nelle specie in cui l'auto-incompatibilità è predominante. La conoscenza dei mutanti auto-fertili dovrà essere invece maggiormente utilizzata per lo sviluppo di marcatori molecolari che facilitino la selezione di nuove varietà portatrici di questo carattere.

Fra le strategie che hanno già dimostrato di saper raggiungere l'auto-fertilità non bisogna sottovalutare l'apporto che potrà essere fornito dalle tecniche di ingegneria genetica. Il dibattito che si sta sviluppando pro e contro l'uso di queste tecnologie non dovrà dimenticare i vantaggi offerti dagli approcci di silenziamento genico. Se poi ci riferiamo al recente dibattito a favore delle sole piante cisgeniche (in cui possono essere utilizzati solo geni nativi identificati nella specie utilizzata nella trasformazione) non bisogna dimenticare che il silenziamento genico non potrà mai essere applicato nella produzione di piante cisgeniche e, pur comprendendo le ragioni che recentemente hanno spinto molti centri di ricerca a guardare con favore queste tecnologie, rinunciare a queste potenzialità sarebbe a nostro avviso comunque un errore.

#### RIASSUNTO

Un passaggio fondamentale per il successo evolutivo delle Angiosperme risiede nello sviluppo di strategie riproduttive mirate a inibire l'auto-fertilità. L'auto-incompatibilità di tipo gametofitico rappresenta una di queste strategie ed è diffusa in diverse famiglie fra le quali le Rosacee. Tale meccanismo è determinato da geni localizzati nel locus S: una ribonucleasi (RNasi S, determinante stilare) e proteine contenenti un dominio F-box (S-Fbox, determinante pollinico). Le RNasi S sono ben caratterizzate grazie alla "genotipizzazione degli alleli S", approccio nato per definire i gruppi inter-fertilità tra le varietà in specie auto-incompatibili e che si è rivelato idoneo per identificare gli alleli mutati nei genotipi auto-fertili. In questo lavoro verranno descritte le dinamiche evolutive del locus S nelle Rosacee, i meccanismi di rigetto del polline e le strategie per ottenere genotipi auto-fertili in queste specie, strategie che, essendo mirate alla produttività, avranno finalità opposte a quelle consociative naturali.

## ABSTRACT

Angiosperms are the most widespread and evolved plants; a key step for their success has been promoting cross-fertilization as a reproductive strategy. The gametophytic self-incompatibility (GSI) system is one of these strategies and it occurs in several families, among which the Rosaceae. Self-incompatibility is determined by the S-locus haplotypes: pistil specificity is determined by a ribonuclease S (S-RNase) while the pollen one is a protein containing an F-box domain (S-Fbox). S-RNases have been characterized in detail thanks to genotyping assays for the S alleles (S-genotyping): this approach was used to define the inter-fertility groups among varieties of self-incompatible species, and it allowed to identify some mutated alleles that originated new self-fertile genotypes. In this review, all of these aspects have been considered as well as the evolution of GSI in Prunoideae (ie *Prunus*) and Pyrinae (ie *Malus* and *Pyrus*). The transgenic approaches used for breaking GSI will be also discussed.

## BIBLIOGRAFIA

- BROOThAERTS W., JANSSENS G.A., PROOST P., BROEKAERT W.F. (1995): *cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple*, «Plant Molecular Biology», 27, pp. 499-511.
- BROOThAERTS W., KEULEMANS J., VAN NERUM I. (2004): *Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing*, «Plant Cell Rep.», 22, pp. 497-501.
- CACHI A.M., WÜNSCH A. (2011): *Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (Prunus avium L.)*, «Journal of Experimental Botany», 62, pp. 1847-1856.
- DARWIN C. (1877): *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*, John Murray, London, p. 293.
- DE FRANCESCHI P., DONDINI L., SANSAVINI S. (2011c): *Il controllo genetico dell'autoincompatibilità gametofitica nelle Rosaceae*, «Italus Hortus», 18, pp. 9-20.
- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANSAVINI S., SANZOL J. (2011a): *Evaluation of candidate F-box genes for the pollen S of gametophytic self-incompatibility in the Pyrinae (Rosaceae), on the basis of their phylogenomic context*, «Tree Genetics and Genomes», 4, pp. 663-683.
- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANZOL J., SANSAVINI S. (2011b): *Cloning and mapping multiple S-locus F-box genes in European pear (Pyrus communis L.)*, «Tree Genetics and Genomes», 7, pp. 231-240.
- DI SANDRO A., SERAFINI-FRACASSINI D., DEL DUCA S., DELLA MEA M., DE FRANCESCHI P., DONDINI L., FALERI C., CAI G. AND SANSAVINI S. (2007): *Pollen Transglutaminase in Pear Self Incompatibility and Relationship with S-RNases and S-Allele Variability*, «Acta Horticulturae», 800, pp. 423-426.
- ENTANI T., IWANO M., SHIBA H., CHE F.S., ISOGAI A., TAKAYAMA S. (2003): *Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of Prunus mume: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity*, «Genes Cells», 8, pp. 203-213.
- GHARESHEIKHBAYAT R. (2010): *Self-incompatibility in apricot (Prunus armeniaca): new achievements and molecular aspects of S-locus allele segregation*, «PhD. Thesis University of Bologna».

- GOLDWAY M., TAKASAKI T., SANZOL J., MOTA M., ZISOVICH A.H., STERN R.A., SANSAVINI S. (2009): *Renumbering the S-RNase alleles of European pears (Pyrus communis L.) and cloning the S109 RNase allele*, «Scientia Horticulturae», 119, pp. 417-422.
- HALASZ J., HEGEDUS A., HERMAN R., STEFANOVITS-BANYAI R., PEDRYC A. (2005): *New self-incompatibility alleles in apricot (Prunus armeniaca L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis*, «Euphytica», 145, pp. 57-66.
- IKEDA K., IGIC B., USHIJIMA K., YAMANE H., HAUCK N.R., NAKANO R., SASSA H., IEZZONI A.F., KOHN J.R., TAO R. (2004): *Primary structural features of the S haplotypespecific F-box protein, SFB, in Prunus*, «Sexual Plant Reproduction», 16, pp. 235-243.
- IGIC B., KOHN R. (2001): *Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases*, «Proceedings Natural Academy of Science», 98, pp. 13167-13171.
- KUBO K., ENTANI T., TAKARA A., WANG N., FIELDS A.M., HUA Z., TOYODA M., KAWASHIMA S., ANDO T., ISOGAI A., KAO T.H., TAKAYAMA S. (2010): *Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility*, «Science», 330, pp. 796-799.
- LIU Z.Q., XU G.H., ZHANG S.L. (2007): *Pyrus pyrifolia stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro*, «Protoplasma», 232, pp. 61-67.
- MINAMIKAWA M., KAKUI H., WANG S., KOTODA N., KIKUCHI S., KOBATA T., SASSA H. (2010): *Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes*, «Plant Molecular Biology», 74, pp. 143-154.
- OKADA K., TONAKA N., MORIYA Y., NORIOKA N., SAWAMURA Y., MATSUMOTO T., NAKANISHI T., TAKASAKI-YASUDA T. (2008): *Deletion of a 236kb region around S4-RNase in a stylar-part mutant S4<sup>tm</sup>-haplotype of Japanese pear*, «Plant Molecular Biology», 66, pp. 389-400.
- SANZOL J. (2009): *Pistil-function breakdown in a new S-allele of European pear, S21\*, confers self-compatibility*, «Plant Cell Reports», 28, pp. 457-467.
- SANZOL J., HERRERO M. (2002): *Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (Pyrus communis L.)*, «Euphytica», 128, pp. 325-331.
- SASSA H., HIRANO H., IKEHASHI H. (1992): *Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese Pear (Pyrus serotina Rehd.)*, «Plant Cell Physiology», 33, pp. 811-814.
- SASSA H., HIRANO H., NISHINO T., KOBATA T. (1997): *Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (Pyrus serotina)*, «Plant Journal», 12, pp. 223-227.
- SASSA H., KAKUI H., MIYAMOTO M., SUZUKI Y., HANADA T., USHIJIMA K., KUSABA M., HIRANO H., KOBATA T. (2007): *S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear*, «Genetics», 175, pp. 1869-1881.
- SASSA H., NISHIO T., KOWYAMA Y., HIRANO H., KOBATA T., IKEHASHI H. (1996): *Self-incompatibility (S): alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily*, «Molecular and General Genetics», 250, pp. 547-557.
- SUTHERLAND B.G., ROBBINS T.P., TOBUTT K.R. (2004): *Primers amplifying a range of Prunus S-alleles*, «Plant Breeding», 123, pp. 582-584.
- TAO R., IEZZONI A.F. (2010): *The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in Prunus exhibits distinct genetic and molecular features*, «Scientia Horticulturae», 124, pp. 423-433.
- TAO R., YAMANE H., SASSA H., MORI H., GRADZIEL T.M., DANDEKAR A.M., SUGIURA A. (1997): *Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (Prunus dulcis)*, «Plant Cell Physiology», 38, pp. 304-311.
- THOMAS S.G., FRANKLIN-TONG V.E. (2004): *Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen*, «Nature», 429, pp. 305-309.

- USHIJIMA K., SASSA H., DANDEKAR A.M., GRADZIEL T.M., TAO R., HIRANO H. (2003): *Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism*, «Plant Cell», 15, pp. 771-781.
- YAMANE H., USHIJIMA K., SASSA H., TAO R. (2003): *The use of the S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for S-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (Prunus mume)*, «Theoretical and Applied Genetics», 107, pp. 1357-1361.
- VILANOVA S., BADENES M.L., BURGOS L., MARTINEZ-CALVO J., LLACER G., ROMERO C. (2006): *Self-Compatibility of Two Apricot Selections Is Associated with Two Pollen-Part Mutations of Different Nature*, «Plant Physiology», 142, pp. 629-641.
- WU J., GU C., DU Y.H., WU H.Q., LIU W.S., LIU N., LU J., ZHANG S.L. (2011): *Self-compatibility of 'Katy' apricot (Prunus armeniaca L.): is associated with pollen-part mutations*, «Sexual Plant Reproduction», 2011 Mar, 24 (1), pp. 23-35. Epub 2010 Jul 24.
- ZISOVICH A.H., STERN R.A., SAPIR G., SHAFIR S., GOLDWAY M. (2004): *The RHV region of S-RNase in the European pear (Pyrus communis) is not required for the determination of specific pollen rejection*, «Sexual Plant Reproduction», 17, pp. 151-156.
- ZHANG Y., ZHAO Z., XUE Y. (2009): *Roles of Proteolysis in Plant Self-Incompatibility*, «Annual Review of Plant Biology», 60, pp. 21-42.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOThaerts W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSAVINI S. (2002): *S-allele characterization in self-incompatible pear (Pyrus communis L.)*, «Sexual Plant Reproduction», 15, pp. 153-158.



GIAMPIERO CAI\*, STEFANO DEL DUCA\*\*,  
DONATELLA SERAFINI-FRACASSINI\*\*, MAURO CRESTI\*

## Deposizione della parete e citoscheletro, crescita del tubetto pollinico e successo riproduttivo

IL TUBETTO POLLINICO È UNA CELLULA A CRESCITA APICALE

Il ruolo del tubetto pollinico è fondamentale durante la riproduzione sessuale nelle piante superiori (gimnosperme e angiosperme) poiché trasporta le cellule spermatiche fino all'oosfera nell'ovulo per consentire il processo di fecondazione. Il tubetto pollinico si forma quando un granulo di polline è deposto sulla superficie di uno stigma ricettivo. Dopo l'attivazione, il tubetto pollinico germina e comincia a crescere all'interno del pistillo con un tasso di crescita considerevolmente alto in alcune specie (0,5-0,7 mm/h in giglio). Sia la crescita del tubetto sia il trasporto delle cellule spermatiche si basano sulla presenza e sull'attività di un apparato citoscheletrico che, come in altre cellule vegetali, è composto da filamenti di actina e microtubuli. Le dinamiche dei filamenti di actina e dei microtubuli, assieme a specifiche proteine associate (motrici e non), rendono il citoscheletro una rete proteica capace di regolare l'intero processo di crescita del tubetto (Cheung e Wu, 2008). La crescita dei tubetti pollinici è caratterizzata dalla sinergia tra la pressione di turgore e la deposizione (apicale) di componenti della parete cellulare (inizialmente rappresentata da pectine) a cui segue la stabilizzazione della parete stessa attraverso la sintesi di callosio e cellulosa (Winship et al., 2010). Mentre i filamenti di actina probabilmente promuovono la crescita e l'accumulo di vescicole contenenti pectina, regolando il loro tasso di fusione, i microtubuli sono ipoteticamente coinvolti nel determinare la direzione di crescita del tubetto pollinico (Gossot e Geitmann, 2007). Entrambe queste funzioni (tasso e direzione di

\* Dipartimento Scienze Ambientali, Università di Siena

\*\* Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

crescita) sono sotto il controllo di segnali esterni (provenienti dalla parte femminile del fiore). Il tubetto pollinico è un modello eccellente per studiare vari aspetti della fisiologia cellulare. Oltre a essere una cellula aploide, il polline può essere raccolto in grandi quantità (almeno per alcune specie), l'estrazione delle sue proteine è relativamente semplice da eseguire, i componenti interni possono essere osservati e monitorati senza sforzo e il polline può essere trasformato geneticamente in modo transitorio con protocolli standard per marcare selettivamente i compartimenti intracellulari. Un'altra peculiarità dei tubetti pollinici è il loro tipo di crescita, denominata apicale, che avviene in un dominio distinto, l'apice del tubetto stesso, dove molte vescicole secretorie si fondono con la membrana plasmatica (Parton et al., 2001). Le vescicole di Golgi presumibilmente contengono componenti pectici della parete cellulare e gli enzimi necessari a sintetizzare callosio e cellulosa (Ketelaar et al., 2008). L'accumulo continuo di entrambi i tipi di materiale promuove la crescita e l'allungamento dei tubetti pollinici. Pertanto, il numero delle vescicole secretorie deve essere mantenuto a livelli costanti all'apice del tubetto al fine di sostenerne la crescita. Le vescicole secretorie sono essenzialmente prodotte dagli apparati di Golgi che presumibilmente si spostano verso l'apice e in direzione opposta lungo l'asse principale del tubetto pollinico. Al pari degli apparati di Golgi, le altre classi di organelli si muovono rapidamente nei tubetti pollinici in modo da distribuirsi uniformemente seguendo il tasso di crescita del tubetto. Anche se il trasporto delle vescicole potrebbe avvenire tramite diffusione, l'attività di focalizzazione dovuta al cosiddetto "collare di actina" nella regione subapicale spinge le vescicole verso l'apice del tubetto (Lovy-Wheeler et al., 2005). Inoltre, i filamenti di actina regolano l'inversione del movimento degli organelli (Cardenas et al., 2005) ed estendono progressivamente il collare di actina. D'altra parte, il ruolo dei microtubuli nella crescita del tubetto pollinico è ancora poco chiaro, anche se i microtubuli sono probabilmente coinvolti nel trasporto/localizzazione *in vitro* di organelli e vescicole (Cai e Cresti, 2009; Cai e Cresti, 2010).

#### I MICROTUBULI PARTECIPANO ALLA LOCALIZZAZIONE DEI MITOCONDRI

I microtubuli sono una componente fondamentale del citoscheletro delle cellule vegetali e svolgono un certo numero di funzioni critiche durante il ciclo cellulare, dalla modellazione della parete cellulare durante l'interfase all'assemblaggio della banda preprofasica, del fuso mitotico e del fragmoplasto durante la divisione cellulare (Brown e Lemmon, 2001). Nel tubetto pollinico,



i microtubuli sono organizzati in fasci lungo l'asse principale del tubetto ma, a differenza dei filamenti di actina, si trovano principalmente nella regione corticale dei tubetti (Del Casino et al., 1993). I microtubuli sono presenti cospicuamente lungo tutto il tubetto pollinico ma sono spesso assenti all'apice del tubetto. Dato che la visualizzazione dei microtubuli nei tubetti pollinici attualmente si basa sull'uso di anticorpi, un'esauriente osservazione dei microtubuli nei tubetti *in vivo* non è ancora stata effettuata e di conseguenza l'organizzazione precisa dei microtubuli è ancora in discussione. L'uso di coloranti fluorescenti non si è dimostrato vantaggioso nel rivelare la struttura dei microtubuli nei tubetti pollinici *in vivo*. D'altra parte, la proteina AtEB1 è stata usata con successo per marcare *in vivo* i microtubuli in tubetti pollinici di tabacco (Cheung et al., 2008). Gli autori del suddetto articolo hanno descritto filamenti di microtubuli più lunghi e stabili nel tubetto e filamenti di microtubuli più brevi nel citoplasma della regione subapicale paralleli all'asse di crescita e in grado di penetrare la regione apicale (Cheung et al., 2008). Questi risultati suggeriscono che ancor più dati sono necessari per descrivere ampiamente l'organizzazione dei microtubuli nel tubetto pollinico, un prerequisito per comprenderne appieno il ruolo. Il rapporto tra dinamica degli organelli e microtubuli non è ancora chiaro. Poiché l'uso di inibitori dei microtubuli non causa effetti chiari sul moto degli organelli, è opinione generale che i microtubuli hanno ben poco a che fare con il movimento degli organelli stessi. Tuttavia, diverse osservazioni (di natura biochimica, citologica e molecolare) mettono in discussione la validità di tale affermazione.

Un possibile ruolo dei microtubuli del tubetto pollinico è legato alla motilità dei mitocondri. Il movimento dei mitocondri è solitamente filamenti di actina-dipendente. D'altro canto, i microtubuli sono coinvolti (direttamente o indirettamente) nel posizionamento dei mitocondri nel cortex delle cellule vegetali (Van Gestel et al., 2002). Le proteine coinvolte nel posizionamento dei mitocondri lungo i microtubuli sono ancora sconosciute. Tuttavia, un membro della superfamiglia delle kinesine di *Arabidopsis* (AtKP1) è stato localizzato su organelli probabilmente simili ai mitocondri (Ni et al., 2005). Nel tubetto pollinico, sia il reticolo endoplasmatico sia i mitocondri mostrano un movimento "oscillatorio" mentre si muovono verso l'apice del tubetto per poi invertire la direzione di spostamento (Wang et al., 2010b). I mitocondri sono stati localizzati maggiormente nella regione subapicale del tubetto (Lovy-Wheeler et al., 2007), con una distribuzione che dipende dai filamenti di actina ma apparentemente non dai microtubuli. Il coinvolgimento di microtubuli e motori dei microtubuli nel movimento dei mitocondri del tubetto pollinico è dunque poco chiaro. Una proteina di 90-kD simile alla kinesina

è stata localizzata sui mitocondri dei tubetti pollinici di tabacco mediante immunoelettromicroscopia (Romagnoli et al., 2007). Poiché la kinesina di 90-kD è in grado di muoversi lungo i microtubuli (Cai et al., 2000), questi dati suggeriscono che i mitocondri possono usare tale kinesina per spostarsi nel tubetto pollinico. Tuttavia, la velocità della kinesina di 90-kD è di circa 0,040  $\mu\text{m/s}$  mentre la velocità *in vitro* dei mitocondri lungo i microtubuli è 0,17  $\mu\text{m/s}$  (Romagnoli et al., 2007); anche se tale discrepanza potrebbe riflettere una non ottimale condizione sperimentale, i dati indicano che i microtubuli possono promuovere un movimento lento oppure una fase di sospensione del moto dei mitocondri. D'altra parte, una miosina di 170-kD è stata localizzata in associazione con i mitocondri del tubetto pollinico (Romagnoli et al., 2007), così come in associazione con altri tipi di organelli (Yokota et al., 1995). A quanto pare, la miosina di 170-kD non è specificamente associata con una sola classe di organelli del tubetto pollinico ma eventualmente promuove il movimento di molti differenti tipi di organelli. Al contrario, la kinesina di 90-kD sembra specificamente associata con i mitocondri (Romagnoli et al., 2007), suggerendo una sorta di specificità nell'utilizzo dei motori dei microtubuli. Questa prova non è sorprendente perché diversi membri della superfamiglia delle kinesine sono ipoteticamente associate a componenti specifici nelle cellule animali; ad esempio, la KIF1B $\beta$  si lega alle vescicole sinaptiche, la KIF3 si lega a vescicole associate alle fodrine, mentre la KIF5 trasporta le vescicole con GRIP1 e la KIF1A trasporta le vescicole contenenti il recettore AMPA (Seog et al., 2004). Nelle piante, alcune kinesine sono specificamente associate a strutture definite, come il fragmoplasto, che è organizzato da due kinesine omologhe (la kinesina-12A PAKRP1 e la kinesina-12B PAKRP1L) che si localizzano esclusivamente nella regione mediana (Lee et al., 2007). Inoltre, la kinesina-13A sembra specificamente localizzata sulle membrane dei Golgi (Lu et al., 2005; Wei et al., 2005; Wei et al., 2009) e la kinesina AtKP1 si trova principalmente in associazione con i mitocondri delle cellule vegetali (Ni et al., 2005). Di conseguenza, l'associazione di kinesine specifiche con particolari organelli non è sorprendente.

Perché i mitocondri avrebbero bisogno di motori appartenenti a diverse famiglie (kinesina e miosina)? Nelle cellule animali, il trasporto dei mitocondri dipende principalmente dai microtubuli e dai loro motori (kinesina e dineina) ma le miosine probabilmente si oppongono al movimento basato sui microtubuli per facilitare l'attracco dei mitocondri in siti specifici (Pathak et al., 2010). Questa constatazione esemplifica l'attuale modello di cooperazione funzionale tra proteine motrici mediante il quale i motori dei microtubuli e dei filamenti di actina coordinano il trasporto di vescicole e organelli nelle

cellule eucariotiche. Anche se il movimento degli organelli nelle cellule vegetali usa regole diverse, le tracce di questo meccanismo di coordinamento potrebbero essere state conservate per regolare la posizione finale degli organelli. Nel tubetto pollinico, il movimento dei mitocondri mostra una distribuzione di velocità caratterizzata da valori medio-bassi mentre la distribuzione delle velocità dei mitocondri nei tubetti pollinici trattati con orizalina è caratterizzata dalla scomparsa delle velocità più basse e dal simultaneo aumento delle frequenze più alte (Romagnoli et al., 2007). Questa evidenza suggerisce che i microtubuli hanno la funzione di rallentare il moto dei mitocondri in luoghi specifici del tubetto pollinico, molto probabilmente nella regione corticale. Questa funzione è probabilmente da mettere in rapporto con il bisogno di maggiori quantità di energia (ATP) in siti specifici del tubetto.

#### I MICROTUBULI CONTROLLANO LA POSIZIONE DEI GOLGI?

Gli apparati di Golgi sono una classe di organelli fondamentale, la cui funzione consiste nell'indirizzare le proteine alla loro destinazione finale nella cellula. Nel tubetto pollinico, i Golgi sono i principali produttori di vescicole secretorie che, dopo essersi accumulate all'apice del tubetto ed essersi fuse con la membrana plasmatica, forniscono nuovi componenti per la crescita del tubetto (cioè molecole della membrana plasmatica e della parete cellulare). La localizzazione dei Golgi nel tubetto pollinico non è completamente chiara. Coloranti come il BODIPY TR-ceramide hanno identificato gli apparati di Golgi nel citoplasma e, maggiormente, in una struttura a forma di collare vicino all'apice del tubetto che circonda l'area arricchita in vescicole (Moscatelli et al., 2007). Tuttavia, in studi effettuati con tubetti pollinici marcati con GFP-Lat52-NtRab2, i Golgi sono stati osservati essere distribuiti in modo uniforme con l'eccezione del dominio apicale (Cheung et al., 2002). I Golgi sono stati localizzati in modo uniforme in tubetti pollinici anche usando un anticorpo contro la proteina 58K (Li e Yan, 2000). Di conseguenza, la precisa localizzazione dei Golgi è ancora da stabilire. Quando i Golgi sono stati localizzati in cellule fogliari mediante espressione di proteine tipiche del Golgi ( $\alpha$ -1,2 mannosidasi) fuse alle GFP (Nebenführ et al., 1999), essi hanno mostrato un movimento descritto come "stop-and-go", consistente in uno scambio tra moto rapido diretto e moto casuale. Il movimento diretto è prevalentemente a carico dei filamenti di actina e delle miosine, mentre i microtubuli sembrano avere una funzione di controllo, dal momento che i farmaci anti-microtubuli inducono un effetto stimolante sul movimento delle membrane.

Anche se il contributo ipotetico dei microtubuli e dei motori dei microtubuli nel movimento dei Golgi non è chiaro, si possono proporre alcuni modelli. L'interazione delle kinesine con i Golgi è stata postulata grazie all'identificazione di una kinesina (la kinesina-13A) sia in cotone sia in *Arabidopsis* (Lu et al., 2005). La proteina motrice è stata co-localizzata con i Golgi, i quali sono stati osservati frequentemente nelle strette vicinanze dei microtubuli, il che suggerisce che la kinesina-13A potrebbe essere coinvolta nell'associazione tra Golgi e microtubuli. L'obiettivo di tale associazione potrebbe essere la regolazione della distribuzione locale dei Golgi nel cortex cellulare; in alternativa, la kinesina-13A potrebbe essere utilizzata per ridistribuire le vescicole rilasciate dalle cisterne del Golgi. È interessante notare che un omologo di questa proteina è stato identificato anche nel tubetto pollinico di tabacco (Wei et al., 2005). Questa proteina co-localizza parzialmente con l'apparato di Golgi e con le vescicole, suggerendo che la kinesina-13A probabilmente controlla il trasporto delle cisterne del Golgi e/o di vescicole derivate dal Golgi nel tubetto pollinico. Allo stesso modo, la AtKinesin-13A è distribuita su vescicole di Golgi nelle cellule della radice di *Arabidopsis* (Wei et al., 2009). Ciò dimostra che membri della famiglia della kinesina-13A possono regolare la posizione dei Golgi nelle cellule vegetali e quindi partecipare al traffico delle vescicole derivate dal Golgi. In questo contesto, è interessante notare che vescicole provenienti da una frazione arricchita di Golgi sono state osservate muoversi lungo i microtubuli, grazie ad analisi di motilità *in vitro*. Inoltre, le membrane di Golgi possono passare da microtubuli a filamenti di actina (e viceversa) suggerendo che i due filamenti citoscheletrici sono necessari per le diverse fasi del moto complessivo dei Golgi (Romagnoli et al., 2007). A causa del protocollo di estrazione utilizzato, le analisi di motilità potrebbero non discriminare tra apparati di Golgi o vescicole di Golgi; tuttavia, le analisi hanno suggerito che il movimento delle membrane del Golgi lungo i microtubuli è piuttosto lento in confronto allo streaming citoplasmatico dei tubetti pollinici e, di conseguenza, che i microtubuli e i motori dei microtubuli non partecipano al traffico generale delle membrane di Golgi. Ipoteticamente, i microtubuli e i loro motori potrebbero invece ottimizzare il posizionamento finale dei Golgi, dopo che questi sono stati trasportati rapidamente lungo i filamenti di actina. Non è noto se i motori dei microtubuli guidano anche il movimento delle vescicole di Golgi, ma questa ipotesi è suggestiva. Infatti, la velocità media *in vitro* delle vescicole di Golgi è di circa 1,78  $\mu\text{m/s}$  lungo i filamenti di actina e di 0,22  $\mu\text{m/s}$  lungo i microtubuli, mentre è di circa 0,75  $\mu\text{m/s}$  in presenza di microtubuli e filamenti di actina (Romagnoli et al., 2007); questi ultimi valori sono paragonabili a quelli misurati nei tubetti pollinici di giglio (Bove

et al., 2008). Inoltre, un anticorpo diretto contro la catena pesante della kinesina di cervello bovino ha identificato una proteina cross-reagente nella regione del tubetto arricchita in vescicole secretorie (Tiezzi et al., 1992); in aggiunta a ciò, le membrane di Golgi estratte da polline di nocciolo sono state osservate in associazione ai microtubuli in condizioni che stimolano il legame tra kinesina e microtubuli (Liu et al., 1994).

Qual è lo scopo delle interazioni tra i Golgi e i microtubuli? Sulla base dei risultati, è possibile proporre un modello in cui i Golgi dei tubetti pollinici migrano rapidamente (e probabilmente per lunghe distanze) lungo i filamenti di actina utilizzando le miosine. Anche se le analisi di motilità *in vitro* hanno indicato che le interazioni tra microtubuli e vescicole di Golgi possono persistere per periodi lunghi (Romagnoli et al., 2007), la velocità del movimento è di 0,1-0,2  $\mu\text{m/s}$ , suggerendo che la distanza coperta dai Golgi lungo i microtubuli potrebbe essere al massimo dell'ordine di pochi micrometri. Si evince pertanto che in siti specifici (ad esempio all'interfaccia tra apice e subapice), i microtubuli potrebbero rallentare localmente il traffico dei Golgi utilizzando i motori kinesina-13A per regolarne finemente la posizione nel tubetto pollinico. Dal momento che la maggior parte dei microtubuli nel tubetto pollinico è distribuita nel cortex cellulare (Del Casino et al., 1993; Lancelle et al., 1987), la decelerazione del movimento dei Golgi è pertanto fondamentale a quel livello. Il movimento iniziale delle vescicole di Golgi potrebbe anche essere guidato dai motori dei microtubuli, che servirebbe di conseguenza per focalizzare le vescicole all'apice del tubetto pollinico.

Un ruolo ipotetico ma interessante delle interazioni tra microtubuli e vescicole di Golgi potrebbe interessare il trasporto locale degli enzimi che sintetizzano la parete cellulare. Infatti, è curioso notare che la cellulosa sintasi CesA3 è stata localizzata nei Golgi e in un compartimento particolare associato ai microtubuli (il cosiddetto MASC) (Crowell et al., 2009). L'inserimento di CesA3 nella membrana plasmatica si verifica quando i Golgi sostano lungo i microtubuli, un passaggio probabilmente necessario per rifornire CesA3 ai MASC, che fungerebbe quindi da stazione di transito per la consegna finale di CesA3 al plasmalemma. Anche se le kinesine sono state ipotizzate non essere utili per bloccare i Golgi lungo i microtubuli (Crowell et al., 2009), l'uso di kinesine per regolare la sintesi di cellulosa mediante la sospensione locale dei Golgi è un'ipotesi affascinante (Szymanski, 2009). Nel tubetto pollinico, la regione dove inizia la sintesi di cellulosa non è nota ma la cellulosa è stata evidenziata intorno a 5-15  $\mu\text{m}$  dall'apice del tubetto (Ferguson et al., 1998). Ipoteticamente, i microtubuli potrebbero bloccare i Golgi nella regione subapicale dei tubetti pollinici e poi guidare le vescicole di Golgi trasportanti

CesA verso il corretto inserimento. Dal momento che la cellulosa è apparentemente necessaria per stabilizzare la direzione di crescita dei tubetti pollinici (Aouar et al., 2010), la depolimerizzazione dei microtubuli potrebbe inibire sia il corretto posizionamento dei Golgi sia la distribuzione delle vescicole che trasportano CesA, alterando così la direzione di crescita dei tubetti (Gossot e Geitmann, 2007).

#### IL CITOSCHELETRO TRASPORTA ANCHE GLI ENZIMI PER LA SINTESI DI CALLOSIO E CELLULOSA

Qual è il rapporto tra citoscheletro e deposizione della parete cellulare nel tubetto pollinico? Come tutte le cellule vegetali, la parete cellulare svolge un ruolo importante nella crescita del tubetto pollinico e in ultima analisi nel favorire la funzione corretta del tubetto stesso. Come descritto in precedenza, il tubetto pollinico deve seguire una serie di segnali durante la sua crescita all'interno del pistillo. Il processo di crescita necessita del trasporto specifico di vescicole secretorie prodotte dal Golgi verso l'apice del tubetto. La fusione delle vescicole produce la prima parete (composta quasi esclusivamente di pectine) a cui fa seguito la deposizione di una parete ulteriore composta di callosio (per la maggior parte) e di cellulosa. Questi due componenti hanno ruoli forse diversi. Mentre il callosio stabilizza la struttura della parete cellulare e le fornisce resistenza, la cellulosa potrebbe essere coinvolta nel favorire la crescita corretta del tubetto pollinico, stabilizzando la sua direzione di crescita (Aouar et al., 2010). Anche se la cellulosa è presente in quantità relativamente basse, la sua presenza determina il diametro dei tubetti pollinici, suggerendo che la cellulosa possa influenzare la struttura complessiva della parete cellulare del tubetto pollinico in crescita. Inoltre, mutanti di *Arabidopsis* difettivi nel gene *AtCSLA7* (che codifica per una proteina simile alla cellulosa sintasi) indicano che il prodotto del gene è importante per la crescita del tubetto pollinico (Goubet et al., 2003). Piante mutanti nei geni codificanti altre proteine simili alla cellulosa sintasi (*CSLD1* e *CSLD4*) sono difettosi nella produzione di tubetti pollinici (Wang et al., 2011). Di conseguenza, la cellulosa è probabilmente importante per lo sviluppo normale dei tubetti. D'altro canto, i microtubuli sono storicamente considerati non essenziali per la corretta crescita dei tubetti, mentre i filamenti di actina avrebbero un ruolo importante in questo processo. Tuttavia, i microtubuli possono influenzare la direzionalità di crescita. Infatti, l'applicazione di inibitori dei microtubuli sulla superficie di fiori ricettivi induce forti alterazioni nella crescita dei tubetti pollinici

(Joos et al., 1995). In secondo luogo, gli inibitori dei microtubuli non hanno effetti sulla capacità dei tubetti pollinici di penetrare una barriera fisica *in vitro* ma possono alterare la loro capacità di mantenere una crescita direzionale (Gossot e Geitmann, 2007). In terzo luogo, anche se i microtubuli sono generalmente assenti all'apice di tubetti pollinici in crescita, possono essere rintracciati in tale zona quando i tubetti pollinici si curvano suggerendo che i microtubuli possano essere richiesti per la curvatura o per mantenere la curvatura (Foissner et al., 2002).

Il trasporto degli enzimi coinvolti nella sintesi di parete è un possibile esempio della cooperazione che potrebbe esistere tra filamenti di actina e microtubuli nel tubetto pollinico (ma non solo). Sebbene i filamenti di actina probabilmente guidano l'inserimento di CesA nella membrana plasmatica apicale, i microtubuli potrebbero regolare l'attività di CesA quando questa già si trova nella membrana plasmatica (Crowell et al., 2010). Questa funzione potrebbe essere realizzata a due diversi livelli. In primo luogo, i microtubuli potrebbero definire sottodomini specifici della membrana plasmatica in cui l'attività di CesA è rafforzata. In secondo luogo, i microtubuli potrebbero localmente regolare l'inserimento o la rimozione di CesA attraverso il controllo del traffico delle membrane contenenti CesA. In questo contesto, le interrelazioni dinamiche tra microtubuli e organelli del tubetto sono progressivamente in fase di chiarificazione. I microtubuli sono coinvolti nel trasporto a corto raggio di vescicole di Golgi, con una velocità media che è notevolmente inferiore rispetto allo streaming citoplasmatico e quindi adatta a regolare tale meccanismo (Romagnoli et al., 2007). Ovviamente ignoriamo se proteine simili a kinesine trasportino oppure ancorino le vescicole contenenti CesA lungo i microtubuli, ma questa ipotesi è affascinante e anche supportata da altre testimonianze. Come già descritto, infatti, la kinesina-13A è un motore che si lega ai Golgi e probabilmente li sposta lungo i microtubuli favorendo la corretta distribuzione dei Golgi e/o quella delle vescicole che da esso derivano (Wei et al., 2009). È interessante notare che la kinesina-13A interagisce anche con RIP3, che a sua volta coopera con proteine ROP, una classe di regolatori della crescita polarizzata dei tubetti pollinici (Mucha et al., 2010). Lo scenario descritto da questi risultati suggerisce che segnali esterni, attraverso il complesso ROP/RIP3, potrebbero influenzare l'attività della kinesina-13A, la quale spinge le membrane di Golgi contenenti CesA verso siti specifici. Anche se il movimento dei compartimenti MASC è stato ipotizzato avvenire grazie all'attività di "treadmilling" dei microtubuli, alcuni membri della famiglia delle kinesine 13 e delle kinesine 8 possono depolimerizzare i microtubuli promuovendo il trasporto di componenti specifici (Grissom et

al., 2009); questo dato suggerisce che il traffico di CesA lungo i microtubuli possa richiedere anche l'attività destabilizzante delle kinesine. Le informazioni di direzionalità percepite dal sistema ROP sarebbero passate ai microtubuli dalla kinesina-13A in modo da regolare l'inserimento di CesA nella membrana plasmatica e la corretta sintesi di cellulosa. Prove di un ipotetico ruolo delle kinesine nell'organizzazione delle fibrille di cellulosa sono state ottenute constatando che la mutazione nel gene FRA1 (che codifica per una proteina simile alla kinesina) causa alterazione nell'orientamento delle fibrille di cellulosa (Zhong et al., 2002). Poiché i Golgi non sono stati specificamente rintracciati all'apice del tubetto pollinico, è probabile che il trasporto finale di CesA avvenga attraverso le vescicole secretorie.

L'associazione tra i microtubuli e la callosio sintasi (CalS) nel tubetto pollinico è basata su un meccanismo diverso. Sebbene CalS sia probabilmente trasportata attraverso le vescicole secretorie verso l'apice del tubetto, i microtubuli non prenderebbero parte nella consegna delle vescicole contenenti CalS nella regione apicale (Cai et al., 2011). Al contrario, i microtubuli sono probabilmente critici nell'accumulare CalS nelle regioni distali del tubetto pollinico. In quelle regioni, CalS è necessaria per la sintesi dei tappi di callosio, strutture che separano il tubetto pollinico vivente dalla regione vacuolare. Analisi biochimiche mediante Blu-Native PAGE hanno dimostrato che CalS si lega alla tubulina, suggerendo che i microtubuli potrebbero interagire direttamente con CalS e non tramite vescicole membranose (Cai et al., 2011). Se così fosse, come riescono i microtubuli a controllare la distribuzione di CalS nella membrana plasmatica? Alcune informazioni provengono da studi recenti sulla distribuzione del callosio nelle pareti periclinali delle cellule di guardia della felce *Asplenium nidus*, dove il callosio si allinea con i sottostanti microtubuli corticali (Apostolakis et al., 2009). Poiché l'orizalina danneggia il pattern di deposizione del callosio, è probabile che l'orientamento del callosio nelle pareti periclinali sia controllato dai microtubuli. L'orizalina inibisce anche l'attività della callosio sintasi nelle cellule di *Arabidopsis* e di tabacco, suggerendo che microtubuli intatti siano necessari per la appropriata sintesi quantitativa del callosio (Aidemark et al., 2009). Queste poche testimonianze indicano che il modello di organizzazione dei microtubuli corticali è fondamentale per la corretta attività di CalS e suggerisce che i microtubuli potrebbero influenzare la deposizione corretta di callosio regolando l'attività enzimatica di CalS. L'associazione tra proteine motrici dei microtubuli e CalS non è chiara anche se il trasporto, mediato da kinesine, di vescicole contenenti CalS è stato ipotizzato durante la formazione della piastra cellulare (Julie Lee et al., 2001). Per quanto riguarda il tubetto pollinico, non abbiamo anco-



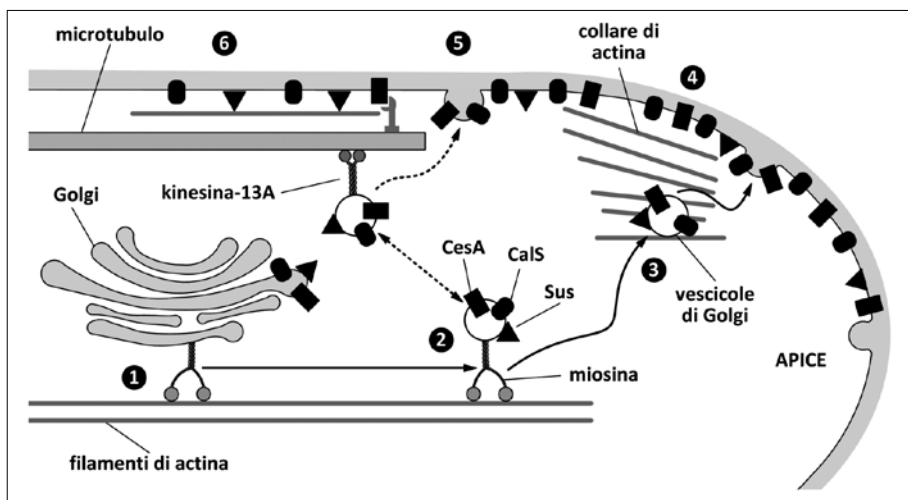


Fig. 1 *Modello ipotetico illustrante i rapporti tra trasporto di membrane, citoscheletro e inserzione degli enzimi sintetizzanti la parete cellulare del tubetto pollinico. Secondo lo schema, una volta sintetizzati, gli enzimi cellulosa sintasi (CesA) e callosio sintasi (CalS) sarebbero veicolati nei Golgi, i quali si muoverebbero attivamente lungo i filamenti di actina (1) grazie alle miosine. I Golgi produrrebbero vescicole secretorie che trasportano gli enzimi fino alla regione apicale grazie a un trasporto lungo i filamenti di actina mediato dalle miosine (2). Le vescicole sarebbero rilasciate nell'apice del tubetto dove interagirebbero con il collare di actina (3) che facilita la loro fusione (4). In alternativa, le vescicole potrebbero anche localmente associarsi con i microtubuli ed essere secrete dopo tale associazione (5). In tal caso, le kinesine-13A potrebbero favorire questo trasporto o ancoraggio locale. Una volta inserite nella membrana plasmatica, gli enzimi CalS e CesA inizierebbero a produrre rispettivamente callosio e cellulosa (6). Nel disegno è anche illustrato il probabile percorso seguito dalla saccarosio sintasi (Sus), l'enzima che fornisce metaboliti sia a CesA sia a CalS*

ra ottenuto prove per uno specifico accumulo di proteine simili alla kinesina nei pressi dei tappi di callosio. Uno schema plausibile delle interazioni tra citoscheletro e deposizione di callosio e cellulosa è illustrato in figura 1.

#### IL CITOSCHELETRO È BERSAGLIO DELL'ATTIVITÀ DELLE TRANSGLUTAMINASI

Il citoscheletro delle cellule eucariotiche è comunemente un bersaglio di vari enzimi che catalizzano modificazioni post-traduzionali allo scopo di regolare le varie attività del citoscheletro (Rosenbaum, 2000). Studi pionieristici dimostrarono che le transglutaminasi (TGasi), enzimi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti, sono capaci di catalizzare la coniugazione di poliammine con tubulina animale, generando prodotti con elevato peso molecolare (Maccioni e Arechaga, 1986).

Nelle piante, esistono pochi dati su questo argomento ma è stato comunque dimostrato che la tubulina del polline può essere modificata dalle poliammine dopo incubazione con estratto pollinico, suggerendo il verificarsi di un'attività TGasi (Del Duca et al., 1997). Altri risultati hanno documentato che la TGasi del polline può modificare il tasso di polimerizzazione della tubulina in presenza di poliammine (Del Duca et al., 2009). La tubulina trattata con TGasi assembla solo in piccola parte a costruire microtubuli e, contemporaneamente, si formano aggregati di alto peso molecolare. Inoltre, il tasso di depolimerizzazione dei microtubuli è ridotto, suggerendo che la coniugazione con poliammine possa generare microtubuli più stabili. Questi aggregati sono probabilmente dimeri o trimeri covalenti di tubulina prodotti dall'attività TGasi e, quando osservati in microscopia ottica, hanno l'aspetto di strutture amorfe con aspetto filamentoso (Del Duca et al., 2009). L'aggiunta di poliammine a più bassa concentrazione (più vicina a quella fisiologica presunta) genera strutture filamentose più simili ai microtubuli. Un'ipotesi ragionevole è che la TGasi del polline formi aggregati di monomeri che possono rallentare il tasso di polimerizzazione della tubulina. Anziché formare dei veri e propri microtubuli, gli aggregati potrebbero indurre la formazione di fasci di microtubuli, non necessariamente formati soltanto da aggregati covalenti di tubulina ma anche da tubulina monomerica "intrappolata" negli aggregati stessi.

La TGasi ha anche effetto sulla dinamica dell'actina. Infatti, la TGasi del polline può coniugare poliammine ai filamenti di actina generando strutture con una dinamica alterata (Del Duca et al., 2009). L'azione della TGasi sui filamenti di actina non è nuova perché diversi dati in letteratura indicano che l'actina è un bersaglio dell'attività enzimatica della TGasi (Del Duca et al., 1997; Eli-Berchoer et al., 2000; Eligula et al., 1998). La funzione esatta di tale modifiche post-traduzionali non è nota ma possiamo ipotizzare che la TGasi regoli la dinamica dei filamenti di actina generando strutture meno dinamiche e quindi più resistenti. L'attività enzimatica della TGasi si esplica non solo a livello delle strutture filamentose del citoscheletro ma anche sui rispettivi motori. Anche se un'azione diretta della TGasi è stata ipotizzata sia per la miosina (Kakugo et al., 2005) sia per la kinesina (Esposito et al., 2001), un'azione inibitoria della TGasi può ottenersi anche dopo modificazioni dei rispettivi filamenti citoscheletrici, come dimostrato da test di legame, analisi di attività enzimatica e test di motilità *in vitro* usando TGasi pollinica purificata (Del Duca et al., 2009). Pertanto è evidente che la TGasi può esercitare un ruolo di regolatore dell'attività dinamica del citoscheletro modulando i fenomeni dinamici che dipendono dalle proteine motrici, quali il trasporto degli organelli. L'azione regolatoria esercitata dalla TGasi nei confronti del

citoscheletro apre la porta ad alcune interessanti ipotesi sul rapporto tra citoscheletro e risposta di auto-incompatibilità, come descritto qui di seguito.

#### INCOMPATIBILITÀ, TGASI, CITOSCHELETRO, PARETE

Come già accennato in precedenza, il tubetto pollinico cresce all'interno del pistillo, seguendo una serie di segnali che si trovano in posizioni diverse lungo l'itinerario di crescita (Higashiyama, 2010). Questi segnali guidano il processo di crescita per permettere al tubetto pollinico di trovare la strada per gli ovuli e di trasportare correttamente le cellule spermatiche. La maggior parte dei segnali sono specie-specifici e possono essere considerati come stimolatori di crescita. Segnali di tipo diverso sono utilizzati nella cosiddetta risposta di auto-incompatibilità (SI, *self-incompatibility*). Il meccanismo SI è un complesso sistema di eventi che si è evoluto per prevenire l'autofecondazione in alcune specie. Esistono tre diversi tipi di SI nelle piante. Nelle Brassicaceae, il sistema di auto-incompatibilità che impedisce l'autoimpollinazione è basato su determinanti S maschili associati alla parete cellulare che interagiscono con recettori kinasici nello stigma (Luu et al., 1999). Il riconoscimento specifico tra determinanti S maschili e femminili avvia il processo di rigetto del polline. In *Papaver rhoeas* (il papavero di campo), la risposta SI necessita di un riconoscimento specifico tra proteine S stigmatiche e il polline, che si traduce nell'inibizione del polline incompatibile. La risposta SI in questa specie pollinica innesca cambiamenti drammatici nella morfologia degli organelli, suggerendo che un processo di "morte cellulare programmata" (PCD) faccia parte del meccanismo di rigetto (Geitmann et al., 2004). In papavero, la SI innesca una serie di segnali  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti, che a loro volta promuovono l'inibizione della crescita apicale, depolimerizzano i filamenti di actina e inducono di conseguenza la PCD. Le dinamiche dei filamenti di actina sono una componente cruciale del controllo della PCD, come dimostrato da test di stabilizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina (Thomas et al., 2006). I cambiamenti nella dinamica dei filamenti di actina innescano un'attività proteasica simile alle caspasi, che probabilmente induce la PCD. I microtubuli sono un secondo obiettivo della risposta SI perché la SI innesca una rapida depolimerizzazione dei microtubuli, mentre la PCD può essere ridotta stabilizzando i microtubuli con taxolo (Poulter et al., 2008). Di conseguenza, il citoscheletro dei tubetti pollinici fa parte del complesso meccanismo che regola l'avanzamento della PCD durante la risposta SI. Il meccanismo molecolare e le proteine coinvolte nel comunicare la PCD dai determinanti S

fino ai filamenti di actina e ai microtubuli sono sconosciuti, anche se recenti studi proteomici stanno iniziando a fare luce (Poulter et al., 2011). Nelle Solanacee, Rosaceae e Plantaginaceae, la risposta SI è invece basata su meccanismi mediati da S-RNasi attraverso i quali i pistilli riconoscono e rigettano il polline (Wang et al., 2003). Le S-RNasi probabilmente degradano l'RNA del polline incompatibile, impedendo così la fecondazione. È probabile che la degradazione dell'RNA non sia il solo meccanismo attraverso cui il polline è rigettato. Altri processi, comprese le modifiche alla concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , così come la modifica dei filamenti di actina, sono forse coinvolti (Liu et al., 2007). Pertanto, i meccanismi molecolari del rigetto del polline auto-incompatibile nelle Papaveraceae e Solanaceae/Rosaceae/Plantaginaceae potrebbero condividere alcune caratteristiche comuni.

Un interessante collegamento tra risposta SI e citoscheletro è anche suggerito dal possibile ruolo svolto dalla TGasi nel mediare questa interazione. Infatti, durante la risposta di auto-incompatibilità in pero sia i livelli di poliammine sia l'attività della TGasi aumentano (Del Duca et al., 2010), suggerendo che l'attività della TGasi sia innescata dalla presenza delle S-RNasi. L'osservazione di tubetti pollinici in pero ha mostrato che la TGasi è distribuita nella porzione attiva (in crescita) dei tubetti pollinici. Questo effetto potrebbe essere forse ottenuto mediante associazione della TGasi con determinate membrane intracellulari. Infatti, analisi mediante immunoelettromicroscopia hanno spesso mostrato un'associazione della TGasi con la membrana plasmatica dei tubetti pollinici, indicando che l'enzima potrebbe essere secreto o depositato in modo da interessare localmente la struttura della parete cellulare. L'associazione della TGasi con la membrana plasmatica e con la parete cellulare è stata confermata anche biochimicamente (manoscritto in preparazione). La distribuzione della TGasi nel tubetto pollinico di pero sembra essere piuttosto simile a quella trovata nei tubetti pollinici di melo (Di Sandro et al., 2010), nel quale la TGasi è probabilmente associata alla parete cellulare. In pero, quando la distribuzione della TGasi è stata analizzata durante l'impollinazione incompatibile, l'enzima si dispone come patch distribuite più o meno irregolarmente lungo il tubetto pollinico (Di Sandro et al., 2010), mostrando un livello di organizzazione che è apparentemente influenzato dalla risposta SI. Inoltre, dati attualmente in fase di verifica indicano che la dinamica delle membrane intracellulari è critica per la distribuzione della TGasi extracellulare. I risultati per adesso ottenuti suggeriscono che gli inibitori del citoscheletro (Latrunculina B per l'actina, orizalina/taxolo per la tubulina) influenzano sensibilmente la localizzazione della TGasi nei tubetti pollinici di pero, riducendo l'accumulo di TGasi nel dominio apicale. Con-

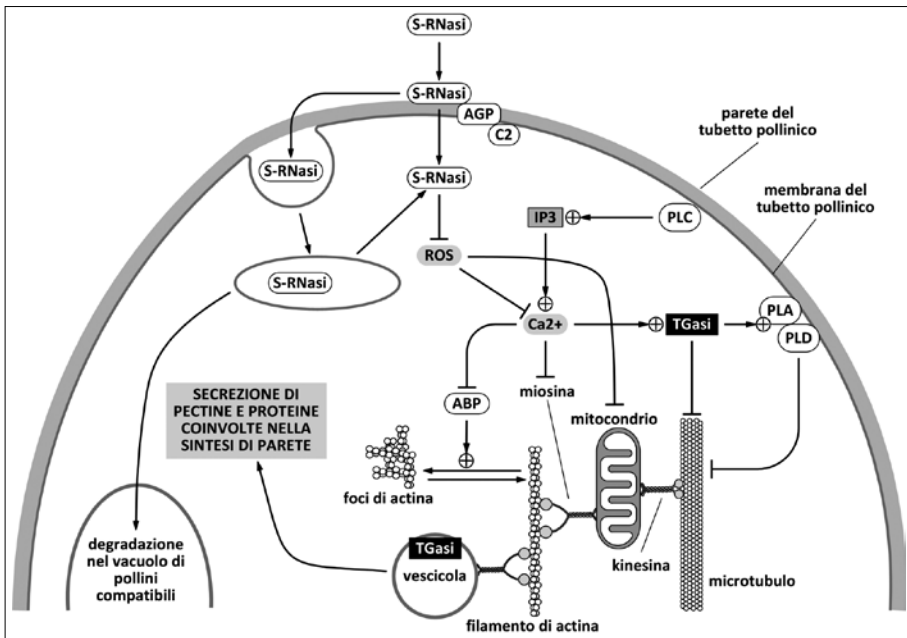


Fig. 2 Schema delle possibili relazioni tra risposta di auto-incompatibilità mediata da S-RNasi, attività delle transglutaminasi (TGasi) e citoscheletro. Nelle risposte di auto-incompatibilità mediate da S-RNasi, queste ultime sarebbero recepite dal tubetto pollinico e riconosciute tramite un legame specifico con arabinogalattano-proteine (AGP) e proteine con dominio C2. Una volta internalizzata (direttamente o indirettamente tramite endocitosi) le S-RNasi ridurrebbero i livelli di ROS (reactive oxygen species) che a loro volta influenzerebbero negativamente i livelli di ioni Ca. Questi ultimi potrebbero agire su diverse molecole. Gli ioni Ca possono influenzare proteine leganti l'actina (ABP, actin binding protein), le quali sarebbero responsabili della trasformazione dei filamenti di actina nei foci di actina. Gli ioni Ca possono anche regolare l'attività enzimatica della miosina e possono modulare l'attività della TGasi. Oltre ad agire direttamente sugli elementi citoscheletrici, la TGasi può regolare le attività delle fosfolipasi A e D (PLA e PLD), le quali sono note controllare la dinamica dei microtubuli. Un'altra classe di fosfolipasi (PLC) può intervenire nella regolazione dei livelli di ioni Ca. Complessivamente, l'effetto della risposta SI potrebbe anche consistere nell'alterazione della secrezione di materiale (pectine) e proteine utili alla costruzione della parete del tubetto pollinico (per chiarezza dell'immagine, non è mostrata l'attività diretta della TGasi sull'actina)

temporaneamente, l'applicazione di Brefeldina A (un inibitore della dinamica delle membrane) o di Latrunculina B determina l'accumulo di TGasi nelle membrane dei tubetti pollinici riducendone la presenza nella parete cellulare.

I dati raccolti nei nostri laboratori suggeriscono l'esistenza di una relazione tra risposta SI, attività della TGasi e dinamiche del citoscheletro/membrane dei tubetti pollinici di pero. Poiché sia l'attività TGasica sia il contenuto di

poliammine cambiano durante l'impollinazione incompatibile (Del Duca et al., 2010), è probabile che i determinanti S possano influire sull'attività della TGasi. L'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, così come osservato durante la risposta SI in pero (Wang et al., 2010a) potrebbe essere legata all'attività TGasica nei tubetti pollinici. Una volta attivata, la TGasi potrebbe disorganizzare i filamenti di actina e i microtubuli tramite modificazioni post-traduzionali, così come fa *in vitro* (Del Duca et al., 2009), conducendo agli effetti osservati in pero (Liu et al., 2007). La riorganizzazione anormale dei filamenti di actina indotta dalla TGasi potrebbe generare anche i cosiddetti "foci di actina" (Poulter et al., 2011), strutture atipiche indotte dalla risposta SI e a cui proteine specifiche dei filamenti di actina prendono parte. La disorganizzazione dei filamenti di actina ovviamente modifica il tasso di crescita dei tubetti pollinici; inoltre, disturbi del traffico vescicolare possono essere responsabili dei cambiamenti nella deposizione/secrezione di TGasi extracellulare. Anche se i dati attuali non ci permettono di discriminare tra modifiche del processo esocitotico o endocitotico, è plausibile supporre che la risposta SI potrebbe impedire la rimozione della TGasi extracellulare o consentire un'eccessiva secrezione di TGasi. Dal momento che livelli precisi di TGasi nella parete cellulare sono necessari per la corretta crescita dei tubetti pollinici (Di Sandro et al., 2010), le modifiche a tali livelli rischierebbero di compromettere il processo di crescita portando così alla PCD. Il percorso ipotetico che collegherebbe la risposta SI all'attività TGasica è schematizzato in figura 2. In sintesi, i dati attuali suggeriscono che la risposta SI possa essere mediata da un cambiamento nella regolazione dell'attività TGasica, che a sua volta può influenzare l'organizzazione e la funzione del citoscheletro e di conseguenza la deposizione della TGasi nella parete cellulare, eleggendo questo enzima a un ruolo chiave durante la risposta SI.

## RIASSUNTO

Il tubetto pollinico è una cellula a crescita apicale fondamentale nella riproduzione delle piante superiori ed è caratterizzata da un intenso traffico di organelli e vescicole, a sua volta dipendente da un esteso apparato citoscheletrico formato da filamenti di actina e microtubuli. Mentre il ruolo dei filamenti di actina è abbastanza noto, la funzione specifica dei microtubuli è incerta, anche se i microtubuli potrebbero essere coinvolti nella localizzazione dei mitocondri e nel posizionamento degli apparati di Golgi. Attraverso il controllo della posizione dei Golgi, i microtubuli trasporterebbero anche gli enzimi per la sintesi di callosio e cellulosa, indispensabili per la costruzione finale della parete cellulare. Essendo una struttura così importante, il citoscheletro è oggetto di diversi meccanismi di regolazione, tra cui quello collegato all'attività delle transglutaminasi. Questi enzimi sono

importanti per vari processi cellulari, tra cui quello legato alla risposta di auto-incompatibilità. Questo legame mette in relazione la funzione del citoscheletro e la struttura della parete cellulare con i meccanismi molecolari coinvolti nel rigetto del polline self.

#### ABSTRACT

The pollen tube is a tip growing cell that is crucial for reproduction of higher plants and is characterized by an intense traffic of vesicles and organelles, which in turn depends on an extended cytoskeletal apparatus consisting of actin filaments and microtubules. While the role of actin filaments is relatively known, the specific function of microtubules is uncertain, although microtubules might be involved in the localization of mitochondria and in the positioning of Golgi apparatus. By controlling the position of Golgi, microtubules might also transport the enzymes for the synthesis of callose and cellulose, which are essential for the construction of the cell wall. Being an important structure, the cytoskeleton is subject to different regulatory mechanisms, including the one related to transglutaminase activity. These enzymes are important for several cellular processes, including the response to auto-incompatibility. This association puts in relation the function of cytoskeleton and cell wall structure with the molecular mechanisms involved in the rejection of self-pollen.

#### BIBLIOGRAFIA

- AIDEMARK M., ANDERSSON C.J., RASMUSSEN A.G., WIDELL S. (2009): *Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized Arabidopsis and tobacco suspension cells*, «BMC Plant Biology», 9, pp. 27.
- AOUAR L., CHEBLI Y., GEITMANN A. (2010): *Morphogenesis of complex plant cell shapes: the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes*, «Sexual Plant Reproduction», 23, pp. 15-27.
- APOSTOLAKOS P., LIVANOS P., GALATIS B. (2009): *Microtubule involvement in the deposition of radial fibrillar callose arrays in stomata of the fern Asplenium nidus L.*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 66, pp. 342-349.
- BOVE J., VAILLANCOURT B., KROEGER J., HEPLER P.K., WISEMAN P.W., GEITMANN A. (2008): *Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching*, «Plant Physiology», 147, pp. 1646-1658.
- BROWN R.C., LEMMON B.E. (2001): *The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle*, «Protoplasma», 215, pp. 35-49.
- CAI G., FALERI C., DEL CASINO C., EMONS A.M.C., CRESTI M. (2011): *Distribution of callose synthase, cellulose synthase and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules*, «Plant Physiology», 155, pp. 1169-1190.
- CAI G., ROMAGNOLI S., MOSCATELLI A., OVIDI E., GAMBELLINI G., TIEZZI A., CRESTI M. (2000): *Identification and characterization of a novel microtubule-based motor associated with membranous organelles in tobacco pollen tubes*, «The Plant Cell», 12, pp. 1719-1736.

- CAI G., CRESTI M. (2009): *Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years*, «Journal of Experimental Botany», 60, pp. 495-508.
- CAI G., CRESTI M. (2010): *Microtubule motors and pollen tube growth - still an open question*, «Protoplasma», 247, pp. 131-143.
- CARDENAS L., LOVY-WHEELER A., WILSEN K.L., HEPLER P.K. (2005): *Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 61, pp. 112-127.
- CHEUNG A.Y., CHEN C.Y., GLAVEN R.H., DE GRAAF B.H.J., VIDALI L., HEPLER P.K., WU H.M. (2002): *Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth*, «The Plant Cell», 14, pp. 945-962.
- CHEUNG A.Y., DUAN Q.h., COSTA S.S., DE GRAAF B.H.J., DI STILIO V.S., FEIJO J., WU H.m. (2008): *The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins*, «Molecular Plant», 1, pp. 686-702.
- CHEUNG A.Y., WU H.M. (2008): *Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes*, «Annual Review of Plant Biology», 59, pp. 547-572.
- CROWELL E.F., GONNEAU M., STIERHOF Y.D., HÖFTE H., VERNHETTES S. (2010): *Regulated trafficking of cellulose synthases*, «Current Opinion in Plant Biology», 13, pp. 700-705.
- CROWELL E.F., BISCHOFF V., DESPREZ T., ROLLAND A., STIERHOF Y.D., SCHUMACHER K., GONNEAU M., HOFTE H., VERNHETTES S. (2009): *Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis*, «The Plant Cell», 21, pp. 1141-1154.
- DEL CASINO C., LI Y., MOSCATELLI A., SCALI M., TIEZZI A., CRESTI M. (1993): *Distribution of microtubules during the growth of tobacco pollen tubes*, «Biology of the Cell», 79, pp. 125-132.
- DEL DUCA S., BREGOLI A.M., BERGAMINI C., SERAFINI-FRACASSINI D. (1997): *Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of Malus domestica pollen*, «Sexual Plant Reproduction», 10, pp. 89-95.
- DEL DUCA S., CAI G., DI SANDRO A., SERAFINI-FRACASSINI D. (2010): *Compatible and self-incompatible pollination in Pyrus communis displays different polyamine levels and transglutaminase activity*, «Amino Acids», 38, pp. 659-667.
- DEL DUCA S., SERAFINI-FRACASSINI D., BONNER P.L., CRESTI M., CAI G. (2009): *Effects of post-translational modifications catalyzed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments*, «Biochemical Journal», 418, pp. 651-664.
- DI SANDRO A., DEL DUCA S., VERDERIO E., HARGREAVES A.J., SCARPELLINI A., CAI G., CRESTI M., FALERI C., IORIO R.A., SHIGEHISA H., FURUTANI Y., COUTTS I.G.C., GRIFFIN M., BONNER P.L., SERAFINI-FRACASSINI D. (2010): *An extracellular transglutaminase is required for apple pollen tube growth*, «Biochemical Journal», 429, pp. 261-271.
- ELI-BERCHOER L., HEGYI G., PATTHY A., REISLER E., MUHLRAD A. (2000): *Effect of intramolecular cross-linking between glutamine-41 and lysine-50 on actin structure and function*, «Journal of Muscle Research and Cell Motility», 21, pp. 405-414.
- ELIGULA L., CHUANG L., PHILLIPS M.L., MOTOKI M., SEGURO K., MUHLRAD A. (1998): *Transglutaminase-induced cross-linking between subdomain 2 of G-actin and the 636-642 lysine-rich loop of myosin subfragment 1*, «Biophysical Journal», 74, pp. 953-963.
- ESPOSITO C., MARINIELLO L., COZZOLINO A., AMORESANO A., ORRU S., PORTA R. (2001): *Rat coagulating gland secretion contains a kinesin heavy chain-like protein acting as a type IV transglutaminase substrate*, «Biochemistry», 40, pp. 4966-4971.



- FERGUSON C., TEERI T.T., SIIKA-AHO M., READ S.M., BACIC A. (1998): *Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of Nicotiana tabacum*, «Planta», 206, pp. 452-460.
- FOISSNER I., GROLIG F., OBERMEYER G. (2002): *Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid*, «Protoplasma», 220, pp. 1-15.
- GEITMANN A., FRANKLIN-TONG V.E., EMONS A.C. (2004): *The self-incompatibility response in Papaver rhoeas pollen causes early and striking alterations to organelles*, «Cell Death and Differentiation», 11, pp. 812-822.
- GOSSOT O., GEITMANN A. (2007): *Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton*, «Planta», 226, pp. 405-416.
- GOUBET F., MISRAHI A., PARK S.K., ZHANG Z., TWELL D., DUPREE P. (2003): *AtCSLA7, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in Arabidopsis*, «Plant Physiology», 131, pp. 547-557.
- GRISSOM P.M., FIEDLER T., GRISHCHUK E.L., NICASTRO D., WEST R.R., RICHARD MCINTOSH J. (2009): *Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement*, «Molecular Biology of the Cell», 20, pp. 963-972.
- HIGASHIYAMA T. (2010): *Peptide signaling in pollen-pistil interactions*, «Plant and Cell Physiology», 51, pp. 177-189.
- JOOS U., VAN AKEN J., KRISTEN U. (1995): *The anti-microtubule drug carbetamide stops Nicotiana sylvestris pollen tube growth in the style*, «Protoplasma», 187, pp. 182-191.
- JULIE LEE Y.R., GIANG H.M., LIU B. (2001): *A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles*, «The Plant Cell», 13, pp. 2427-2439.
- KAKUGO A., SUGIMOTO S., SHIKINAKA K., GONG J.P., OSADA Y. (2005): *Characteristics of chemically cross-linked myosin gels*, «Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition», 16, pp. 203-218.
- KETELAAR T., GALWAY M.E., MULDER B.M., EMONS A.M.C. (2008): *Rates of exocytosis and endocytosis in Arabidopsis root hairs and pollen tubes*, «Journal of Microscopy», 231, pp. 265-273.
- LANCELE S.A., CRESTI M., HEPLER P.K. (1987): *Ultrastructure of cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of Nicotiana tabacum*, «Protoplasma», 140, pp. 141-150.
- LEE Y.R.J., LI Y., LIU B. (2007): *Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis*, «The Plant Cell», 19, pp. 2595-2605.
- LI Y., YAN L. (2000): *Golgi 58K-like protein in pollens and pollen tubes of Lilium davidii*, «Science in China Series C: Life Sciences», 43, pp. 402-408.
- LIU G.Q., CAI G., DEL CASINO C., TIEZZI A., CRESTI M. (1994): *Kinesin-related polypeptide is associated with vesicles from Corylus avellana pollen*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 29, pp. 155-166.
- LIU Z.q., XU G.h., ZHANG S.I. (2007): *Pyrus pyrifolia stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro*, «Protoplasma», 232, pp. 61-67.
- LOVY-WHEELER A., CARDENAS L., KUNKEL J.G., HEPLER P.K. (2007): *Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 64, pp. 217-232.
- LOVY-WHEELER A., WILSEN K.L., BASKIN T.I., HEPLER P.K. (2005): *Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube*, «Planta», 221, pp. 95-104.

- LU L., LEE Y.R.J., PAN R., MALOOF J.N., LIU B. (2005): *An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in Arabidopsis*, «Molecular Biology of the Cell», 16, pp. 811-823.
- LUU D.T., MARTY-MAZARS D., TRICK M., DUMAS C., HEIZMANN P. (1999): *Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins*, «The Plant Cell», 11, pp. 251-262.
- MACCIONI R.B., ARECHAGA J. (1986): *Transglutaminase (TG) involvement in early embryogenesis*, «Experimental Cell Research», 167, pp. 266-270.
- MOSCATELLI A., CIAMPOLINI F., RODIGHIERO S., ONELLI E., CRESTI M., SANTO N., IDILLI A. (2007): *Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold*, «Journal of Cell Science», 120, pp. 3804-3819.
- MUCHA E., HOEFLE C., HÜCKELHOVEN R., BERKEN A. (2010): *RIP3 and AtKinesin-13A - A novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules*, «European Journal of Cell Biology», 89, pp. 906-916.
- NEBENFÜHR A., GALLAGHER L.A., DUNAHAY T.G., FROHLICK J.A., MAZURKIEWICZ A.M., MEEHL J.B., STAEHELIN L.A. (1999): *Stop-and-go movements of plant golgi stacks are mediated by the acto-myosin system*, «Plant Physiology», 121, pp. 1127-1142.
- NI C.Z., WANG H.Q., XU T., QU Z., LIU G.Q. (2005): *AtKP1, a kinesin-like protein, mainly localizes to mitochondria in Arabidopsis thaliana*, «Cell Research», 15, pp. 725-733.
- PARTON R.M., FISCHER-PARTON S., WATAHIKI M.K., TREWAVAS A.J. (2001): *Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes*, «Journal of Cell Science», 114, pp. 2685-2695.
- PATHAK D., SEPP K.J., HOLLENBECK P.J. (2010): *Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria*, «Journal of Neuroscience», 30, pp. 8984-8992.
- POULTER N.S., BOSCH M., FRANKLIN-TONG V. (2011): *Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of Papaver pollen*, «Annals of Botany», 108, pp. 659-675.
- POULTER N.S., VATOVEC S., FRANKLIN-TONG V.E. (2008): *Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in Papaver pollen*, «Plant Physiology», 146, pp. 1358-1367.
- ROMAGNOLI S., CAI G., FALERI C., YOKOTA E., SHIMMEN T., CRESTI M. (2007): *Microtubule- and actin filament-dependent motors are distributed on pollen tube mitochondria and contribute differently to their movement*, «Plant Cell Physiology», 48, pp. 345-361.
- ROSENBAUM J. (2000): *Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last*, «Current Biology», 10, pp. R801-R803.
- SEOG D.H., LEE D.H., LEE S.K. (2004): *Molecular motor proteins of the kinesin superfamily proteins (KIFs): structure, cargo and disease*, «Journal of Korean Medical Science», 19, pp. 1-7.
- SZYMANSKI D.B. (2009): *Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control*, «Current Opinion in Plant Biology», 12, pp. 735-744.
- THOMAS S.G., HUANG S., LI S., STAIGER C.J., FRANKLIN-TONG V.E. (2006): *Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen*, «Journal of Cell Biology», 174, pp. 221-229.
- TIEZZI A., MOSCATELLI A., CAI G., BARTALESI A., CRESTI M. (1992): *An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in Nicotiana tabacum pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 21, pp. 132-137.
- VAN GESTEL K., KOHLER R.H., VERBELEN J.P. (2002): *Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules*, «Journal of Experimental Botany», 53, pp. 659-667.

- WANG C.L., WU J., XU G.H., GAO Y., CHEN G., WU J.Y., WU H., ZHANG S.L. (2010a): *S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of Pyrus pyrifolia*, «Journal of Cell Science», 123, pp. 4301-4309.
- WANG H., TSE Y.C., LAW A.H., SUN S.S., SUN Y.B., XU Z.F., HILLMER S., ROBINSON D.G., JIANG L. (2010b): *Vacuolar sorting receptors (VSRs) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) are essential for pollen tube growth*, «Plant Journal», 61, pp. 826-838.
- WANG W., WANG L., CHEN C., XIONG G., TAN X.Y., YANG K.Z., WANG Z.C., ZHOU Y., YE D., CHEN L.Q. (2011): *Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes*, «Journal of Experimental Botany», 62, pp. 5161-5177.
- WANG Y., WANG X., SKIRPAN A.L., KAO T.h. (2003): *S-RNase-mediated self-incompatibility*, «Journal of Experimental Botany», 54, pp. 115-122.
- WEI L., LIU B., LI Y. (2005): *Distribution of a kinesin-related protein on Golgi apparatus of tobacco pollen tubes*, «Chinese Science Bulletin», 50, pp. 2175-2181.
- WEI L., ZHANG W., LIU Z., LI Y. (2009): *AtKinesin-13A is located on Golgi-associated vesicle and involved in vesicle formation/budding in Arabidopsis root-cap peripheral cells*, «BMC Plant Biology», 9, pp. 138-
- WINSHIP L.J., OBERMEYER G., GEITMANN A., HEPLER P.K. (2010): *Under pressure, cell walls set the pace*, «Trends in Plant Science», 15, pp. 363-369.
- YOKOTA E., McDONALD A.R., LIU B., SHIMMEN T., PALEVITZ B.A. (1995): *Localization of a 170 kDa myosin heavy chain in plant cells*, «Protoplasma», 185, pp. 178-187.
- ZHONG R., BURK D.H., MORRISON W.H., III, YE Z.H. (2002): *A kinesin-Like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength*, «The Plant Cell», 14, pp. 3101-3117.



## Controllo molecolare dello sviluppo dell'ovulo

### INTRODUZIONE

Gli ovuli sono strutture molto specializzate costituiti da tre regioni morfologicamente e funzionalmente distinte: la nucella, la calaza e il funicolo. La nucella funziona da megasporangio e al suo interno si sviluppa la cellula madre delle megaspore che in seguito al processo di sporogenesi e gametogenesi formerà il gametofito femminile. La calaza costituisce la porzione centrale del primordio e da questa si originano uno o due tegumenti che circondano e racchiudono il gametofito femminile mantenendo una piccola apertura, il micropilo entro cui penetrerà il tubetto pollinico durante il processo di fecondazione. Infine, l'ovulo è connesso alla parete dell'ovario tramite il funicolo (Yadegari and Drews, 2004).

In Arabidopsis, quando il gametofito femminile raggiunge la maturità è composto da sette cellule: la cellula uovo, che è fiancheggiata dalle due cellule sinergidi, la cellula centrale diploide e tre cellule antipodali (fig. 1A). Al contrario, il granulo di polline consiste di sole tre cellule: una cellula vegetativa responsabile della formazione del tubetto pollinico, e due cellule germinative (fig. 1B). La formazione della generazione sporofitica successiva dipende dall'interazione tra il gametofito femminile e quello maschile.

Nelle Angiosperme il processo di fecondazione coinvolge entrambe le due cellule spermatiche, una feconda la cellula uovo per formare lo zigote da cui si svilupperà l'embrione, mentre l'altra feconda la cellula centrale diploide per dare origine all'endosperma, che protegge l'embrione e gli fornisce nutrimento durante il suo sviluppo (Sundaresan et al., 2010).

\* Dipartimento di BioScienze, Università di Milano

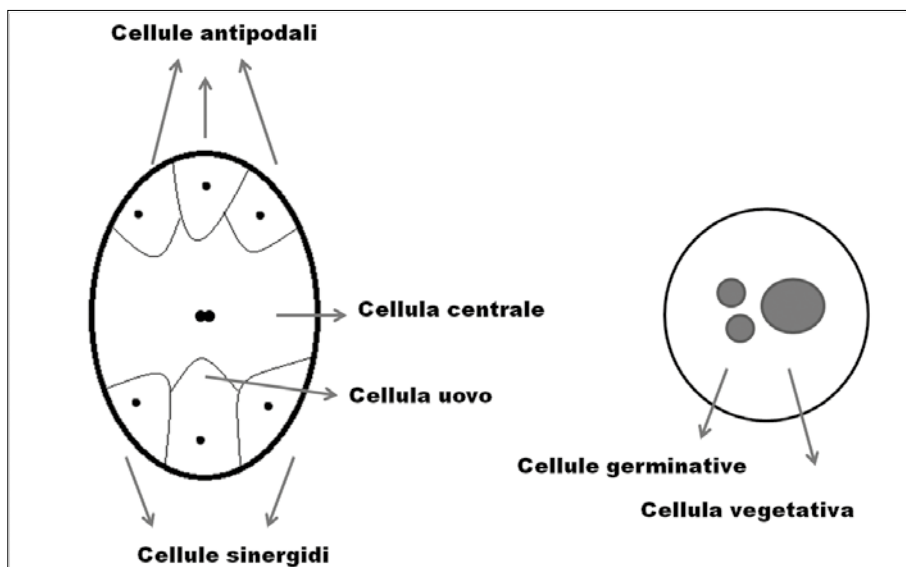


Fig. 1 (A) Rappresentazione schematica del sacco embrionale e (B) di un granulo pollinico di «*Arabidopsis thaliana*»

È noto che i membri della famiglia di fattori trascrizionali MADS-box svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del fiore. I geni MADS-box codificano per fattori di trascrizione che presentano tutti lo stesso dominio di legame con il DNA. Il dominio MADS (acronimo derivato dai nomi dei geni in cui esso è stato individuato per la prima volta), riconosce sempre una particolare sequenza di DNA: la CArG-box, caratterizzata dalla presenza del motivo CC[A/T]<sub>6</sub>GG. In *Arabidopsis* sono stati identificati più di 100 geni MADS-box, che controllano funzioni fondamentali dello sviluppo quali la formazione dei fiori, e lo sviluppo dei semi e la transizione florale.

È stato inoltre dimostrato che i fattori MADS-box agiscono formando complessi multimerici come, ad esempio i fattori STK, SHP1, SHP2 e SE-PALLATA (SEP) che promuovono lo sviluppo dell'ovulo e del carpello (Favaro et al., 2002).

Recentemente sono stati resi noti dati d'immunoprecipitazione della cromatina che hanno evidenziato come i fattori di trascrizione di tipo MADS-box si leghino a centinaia di regioni nel genoma di *Arabidopsis*. Questi fattori sembrano agire come regolatori globali dell'espressione genica durante i vari stadi di sviluppo del fiore (Smaczniak et al., 2011, Kaufmann et al., 2009).

Per esempio STK regola la trascrizione di geni, non solo coinvolti nella

determinazione dell'identità dell'ovulo, ma anche coinvolti nel metabolismo delle cellule di cui determina l'identità (Mizzotti et al., 2012). In questo manoscritto si presentano i risultati ottenuti relativamente alla caratterizzazione di uno dei target di STK, *VERDANDI*, un gene codificante per un fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia B3, coinvolto nella determinazione dell'identità delle sinergidi e della loro funzionalità (Matias-Hernandez et al., 2010).

## RISULTATI

### *VDD è necessario per l'apoptosi delle sinergidi*

Il pattern di espressione di *VDD* è stato studiato mediante esperimenti di real-time PCR e di ibridazione *in situ*. Queste analisi hanno evidenziato che *VDD* è espresso nelle infiorescenze e nel meristema florale. Durante la formazione dell'ovulo, *VDD* è espresso in tutti gli stadi dello sviluppo.

Allo scopo di studiare la funzione del gene *VDD*, è stato studiato l'allele mutante *vdd-1*; l'analisi di segregazione nella progenie di piante eterozigoti dei *VDDvdd-1* ha mostrato un rapporto di segregazione 1:1 con totale assenza di individui omozigote per l'allele *vdd-1*. Le silique di piante eterozigoti *VDDvdd-1* mostrano circa il 50% di ovuli non fecondati (Matias-Hernandez et al., 2010).

Per esaminare se il difetto di fecondazione osservato fosse dovuto a un difetto durante lo sviluppo del sacco embrionale, sono state eseguite analisi mediante microscopia a contrasto interferenziale su piante eterozigoti *VDDvdd-1*. L'analisi di ovuli maturi non fecondati ha evidenziato che tutti gli ovuli in piante eterozigoti *VDDvdd-1* sono morfologicamente indistinguibili dagli ovuli di piante wild type (fig. 2).

Ulteriori analisi per mezzo di incroci di piante *VDDvdd-1* con linee marker specifiche per i diversi tipi di cellule del gametofito, hanno mostrato che le identità della cellula centrale e della cellula uovo sono specificate come nel wild type, mentre circa metà dei gametofiti delle piante *VDDvdd-1* presentano cellule sinergidi e antipodali non si differenziano correttamente (Matias-Hernandez et al., 2010).

Per verificare che la perdita dell'identità delle sinergidi comprometta l'attrazione del tubetto pollinico i pistilli di piante *VDDvdd-1* sono stati impollinati manualmente e in seguito colorati mediante blue di anilina per eviden-

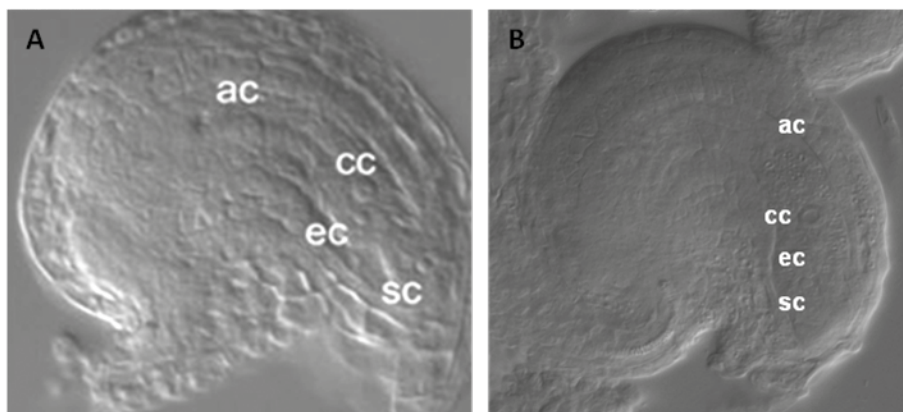


Fig. 2 (A) Ovulo maturo di una pianta *wild-type*. (B) Ovulo maturo di pianta *vdd-1*

ziare i tubetti pollinici. Inaspettatamente i tubetti pollinici arrivano a tutti gli ovuli delle piante *VDDvdd-1* ed entrano correttamente a livello del micropilo (fig. 3).

L'analisi morfologica delle fasi successive ha permesso di verificare che nelle piante *VDDvdd-1* solo la metà degli ovuli presenta degenerazione delle sinergide in seguito alla penetrazione del tubetto pollinico, evento necessario al fine di portare a termine il processo di doppia fecondazione (fig. 4). Questo dato suggerisce che *VDD* sia coinvolto nel processo di apoptosi della sinergide in seguito all'entrata del tubetto pollinico nel sacco embrionale.

## DISCUSSIONE

L'importanza dei fattori di trascrizione MADS-box nei differenti stadi di sviluppo della pianta è stata discussa ampiamente negli anni passati. In questo lavoro è stata evidenziata l'importanza del complesso STK-SEP3 nella regolazione di un processo molto specifico ma estremamente importante per il processo riproduttivo.

In particolare grazie a questo studio è stato possibile comprendere la grande importanza rivestita dal complesso STK-SEP3 durante il processo di doppia fecondazione in *Arabidopsis thaliana*. Questo complesso regola direttamente *VDD*, un membro della famiglia B3, che gioca un ruolo essenziale nel processo di fecondazione.

*VDD* è coinvolto nella specificazione dell'identità e nella funzionalità delle sinergidi. Nel mutante *VDDvdd-1* le cellule sinergidi nel 50% dei gametofiti hanno



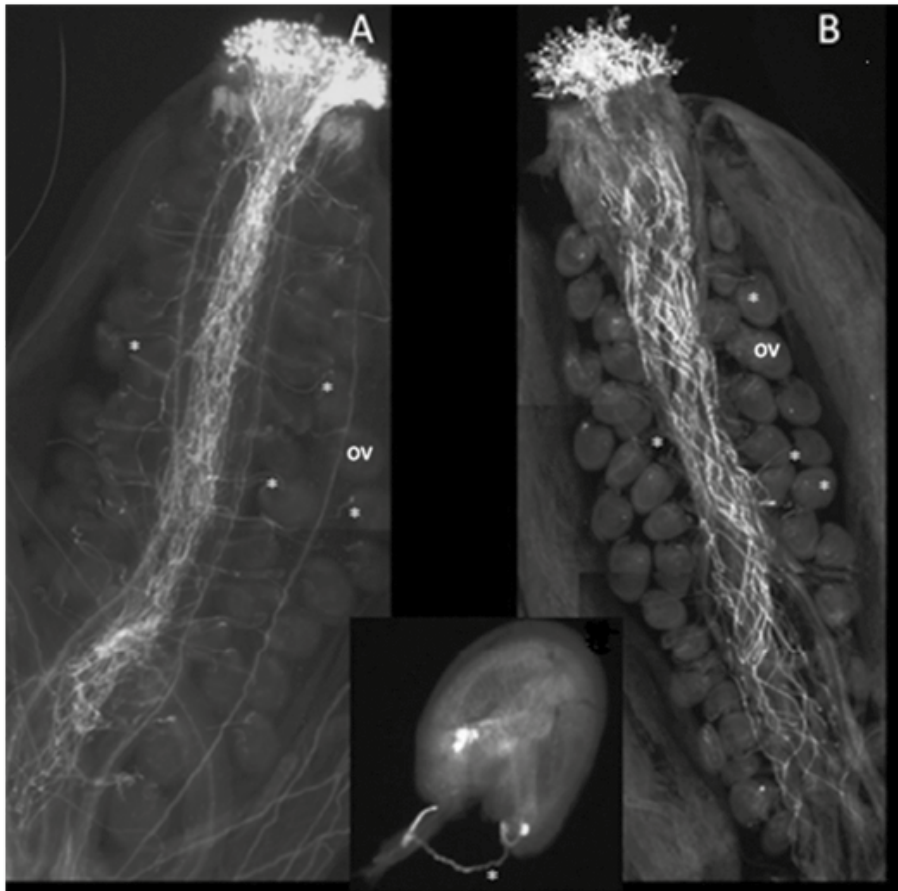


Fig. 3 Nelle piante wild-type (A) e nelle piante *vdd-1* (B) il tubetto pollinico (\*) arriva a tutti gli ovuli. (C) Nel dettaglio, è possibile vedere un ovulo wild-type e il tubetto pollinico. Abbreviazioni: ov, ovulo

perso la loro identità ma questo non ha compromesso l'attrazione del tubetto pollinico; questi risultati suggeriscono che l'attrazione del tubetto pollinico e la degenerazione delle sinergidi sono due processi completamente separati anche se entrambi regolati dalle sinergidi (fig. 5). Questo è un chiaro esempio di come i complessi di fattori MADS box siano coinvolti non solo nella determinazione dell'identità degli organi, ma anche nel regolare il funzionamento degli organi stessi.

A conferma di questo, recentemente si è scoperto che molti dei target diretti dei complessi costituiti da questi fattori di trascrizione sono, geni che codificano per enzimi fondamentali del metabolismo cellulare (Kaufmann et al., 2010; Kaufmann et al., 2009).

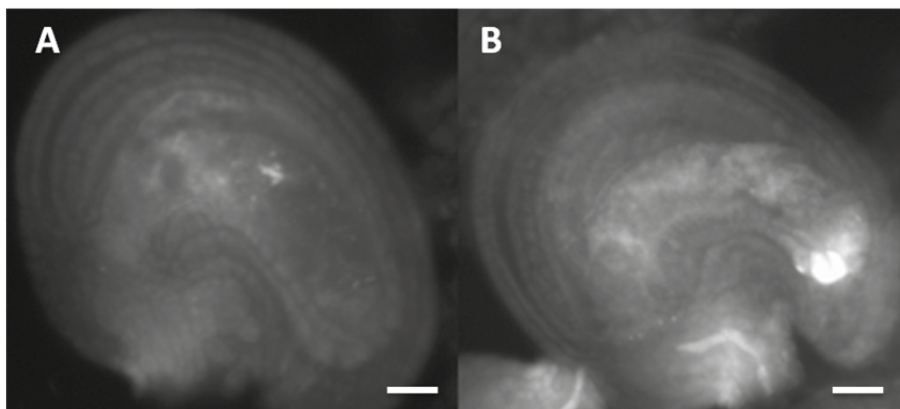


Fig. 4 (A) Ovulo wild-type prima della degenerazione (B) Ovulo wild-type dopo la degenerazione

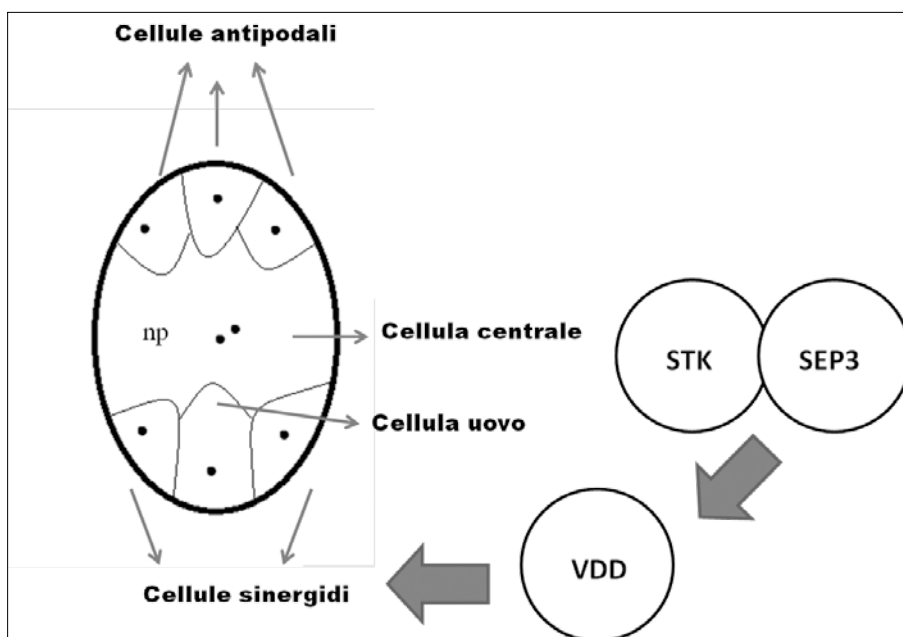


Fig. 5 Il complesso composto dalle proteine SEEDSTICK (STK) e SEPPALLATA3 (SEP3) regola direttamente il gene VERDANDI (VDD) il quale svolge un ruolo essenziale nello sviluppo delle cellule sinergidi

## MATERIALI E METODI

*Materiale vegetale e crescita delle piante*

Piante wild-type di *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia e piante transgeniche sono state cresciute a 22° C in condizioni di fotoperiodo lungo (16h di luce/ 8h di buio). Le linee marker per le cellule del gametofito sono quelle descritte in Matias Hernandez et al., 2010.

Tutte le linee marker per il gametofito femminile codificano per un segnale di localizzazione nucleare che è in frame con il gene reporter GUS. Il mutante *VDDvdd-1* proviene dalla collezione Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL 50\_C03) e contiene l'inserzione di un T-DNA nel primo introne, 44pb a monte del secondo esone.

*Analisi del genotipo*

L'identificazione dell'allele mutante *VDDvdd-1* è stata eseguita mediante analisi PCR usando i primers 5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3(TDNA)e 5'-CGAAGGAGAGAAGCAGAGATG-3'. L'allele wild-type di *VDD* è stato identificato usando il primer 5'-TGAAGTACCGGCTTCAGAGTC-3'.

*Analisi di microscopia*

Per analizzare lo sviluppo dell'ovulo in piante eterozigoti *vdd-1* fiori a differenti stati di sviluppo sono stati posti nella soluzione di clearing per una notte usando una soluzione composta da 160 g di cloro idrato (C-8383; Sigma-Aldrich), 100mL di acqua e 50 mL di glicerolo. Gli ovuli sono stati osservati mediante un microscopio Zeiss Axiophot D1.

Per la colorazione mediante blu di anilina, piante eterozigoti *VDDvdd-1* sono state emasculate e impollinate 24h dopo l'emasculazione. Dopo, 16-18 h i pistilli sono stati raccolti e fissati in una soluzione composta da acido acetico e etanolo assoluto (1:3), in seguito trattati con NaOH 8N e colorati con blu di anilina (Sigma).

Per l'analisi di degenerazione della cellula sinergide, piante wild type eterozigoti *VDDvdd-1* sono state impollinate con una linea marker specifica per il tubetto pollinico e delle cellule spermatiche (contenente il transgene

pAKV::H2B-GFP). Dopo 16h i pistilli sono stati raccolti e osservati al microscopio ottico Zeiss®Axiophot D1 10X, 20X, 40X e 100X a immersione munito di obiettivo a contrasto interferenziale. Le fotografie sono state scattate utilizzando una camera Zeiss Axiocam MRc5 e il programma Axiovision (versione 4.1).

## RIASSUNTO

Negli ultimi anni si è compiuto uno sforzo notevole per capire quali siano i fattori che controllano lo sviluppo dell'ovulo e gli eventi che precedono e seguono il processo di doppia fecondazione, necessari alla formazione dei semi. Gli aspetti più interessanti, da un punto di vista applicativo sono il controllo del numero degli ovuli all'interno dell'ovario e la possibilità di avere un'efficiente fecondazione anche in condizioni di stress ambientali che normalmente influiscono negativamente sull'efficienza del processo stesso. La scelta di numerosi gruppi di ricerca è stata quella di focalizzarsi sullo studio dei processi di riproduzione in specie modello quali *Arabidopsis* o riso, tenendo conto dell'elevato grado di conservazione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dello sviluppo degli organi riproduttivi e del processo di fecondazione.

In particolare in *Arabidopsis* sono stati identificati i geni che controllano lo sviluppo dell'ovulo e del gametofito femminile. I fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia MADS-box quali STK, SHP1, SHP2 e SEP formano un complesso multimerico in grado di regolare centinaia di geni targets coinvolti nelle diverse fasi di sviluppo dell'ovulo e del seme di *Arabidopsis*. Uno di questi target è *VERDANDI(VDD)* un fattore che svolge un ruolo essenziale nello sviluppo del gametofito femminile ed è coinvolto nella determinazione dell'identità delle cellule accessorie del sacco embrionale (cellule sinergidi e antipodali).

## ABSTRACT

In the last years an effort has been made to understand the regulatory network that controls ovule development and the fertilization process. The events that occur before and after the double fertilization are extremely important because they assure seed set and thereby the next plant generation. One of the most important economical aspects of this process is the control of the number of ovules that are produced in each carpel and the possibility to optimize the fertilization process. The choice of various research groups to use model species like *Arabidopsis* or rice, is due to the fact that the molecular mechanisms controlling the fertilization process seems to be widely conserved in the plant kingdom and therefore the use of these model species provides a benefit to study this process.

In *Arabidopsis* three MADS-box genes, *SEEDSTICK (STK)*, *SHATTERPROOF1 (SHP1)* and *SHP2*, redundantly control ovule development. Furthermore, genetic and protein interaction studies have shown that these ovule identity factors are able to interact with the *SEPALLATA (SEP)* MADS domain factors. The interaction between these MADS proteins has shown to be essential for ovule development. Our lab identified the first target gene of the STK-SEP3 complex, which is *VERDANDI (VDD)*, a putative

transcription factor that belongs to the poorly characterized REM family. *VDD* has a role during female gametophyte development and is involved in the determination of the identity of the embryo sac accessory cells, which are important in the fertilization process.

# BIBLIOGRAFIA

- BRAMBILLA V., BATTAGLIA R., COLOMBO M., MASIERO S., BENCIVENGA S., KATER M.M., AND COLOMBO L. (2007): *Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS-box factors support ovule development in Arabidopsis*, «Plant Cell», 19, pp. 2544-2556.
- FAVARO R., IMMINK R.G.H., FERIOLI V., BERNASCONI B., BYZOVA M., ANGENENT G.C., KATER M.M., COLOMBO L. (2002): *Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants*, «Mol. Genet. Genomics», 268, pp. 152-159.
- KAUFMANN K., MUIÑO J.M., JAUREGUI R., AIROLDI C.A., SMACZNIAK C., KRAJEWSKI P., ANGENENT G.C. (2009): *Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower*, «PLoS Biology», 21, 7 (4).
- KAUFMANN K., WELLMER F., MUIÑO J.M., FERRIER T., WUEST S. E., KUMAR V., SERRANO-MISLATA A., MADUEÑO F., KRAJEWSKI P., MEYEROWITZ E. M., ANGENENT G.C., RIECHMANN J. L. (2010): *Orchestration of Floral Initiation by APETALA1*, «Science», 238.
- MATIAS-HERNANDEZ L., BATTAGLIA R., GALBIATI F., RUBES M., EICHENBERGER C., GROSSNIKLAS U., KATER M.M., COLOMBO L. (2010): *VERDANDI Is a Direct Target of the MADS Domain Ovule Identity Complex and Affects Embryo Sac Differentiation in Arabidopsis*, «The Plant Cell», 22, pp. 1702-1715.
- MIZZOTTI C., MENDES M.A., CAPORALI E., SCHNITTGER A., KATER M.M., BATTAGLIA R., COLOMBO L. (2012): *The MADS-box genes SEEDSTICK and ARABIDOPSIS BSISTER play a maternal role in fertilization and seed development*, «The Plant Journal», 70, pp. 409-420.
- NURRISH S.J., TREISMAN R. (1995): *DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors*, «Mol. Cell. Biol», 15, pp. 4076-85.
- SMACZNIAKA C., IMMINKB R., MUIÑOM J., BLANVILLAIND R., BUSSCHERB M., BUSSCHER-LANGEBDINHB J.P., LIUH S., WESTPHALI A., BOERENI S., PARCY F., XUH L., CRISTEL C., ANGENENT G. AND KAUFMANN K. (2012): *Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development*, PNAS 1560-1565.
- SUNDARESAN V., ALANDETE-SAEZ M. (2010): *Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants*, «Development», 137, pp. 179-189.
- YADEGARI R., DREWS G.N. (2004): *Female gametophyte development*, «The Plant Cell», 16, pp. 133-141.



## Espressione differenziale di alfa e beta tubulina come marker dello sviluppo in *Vitis vinifera* L.

### INTRODUZIONE

Il citoscheletro delle cellule vegetali è una combinazione di differenti proteine che, interagendo specificatamente tra loro, servono al mantenimento della posizione e della dinamica di varie strutture endocellulari. Questa rete proteica è necessaria alla stabilità strutturale del citoplasma, all'ancoraggio di proteine e altre macromolecole, partecipa all'assemblaggio del fuso mitotico durante la separazione dei cromosomi, mantiene un preciso ordine interno alla cellula e contribuisce alla sintesi e alla struttura della parete cellulare nelle piante (Nick, 2007). I microtubuli sono polimeri eterodimerici di proteine globulari ( $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina); queste ultime si allineano testa-coda a formare protofilamenti di lunghezza variabile. Generalmente, 13 protofilamenti formano un cilindro con diametro di circa 25 nm, il microtubulo. La caratteristica dei microtubuli è di essere dinamici, essendo capaci di assemblarsi e disassemblarsi rapidamente in risposta a fattori molto diversi e capaci di determinare la lunghezza e la stabilità dei microtubuli stessi.

La tubulina è il componente principale del citoscheletro microtubulare ed esiste come due subunità distinte molto simili in sequenza e struttura ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Le due proteine sono codificate da famiglie multigeniche, il cui numero varia da specie a specie. Generalmente, l'isoforma  $\alpha$  è codificata da un numero minore di geni (da 4 a 6) rispetto all'isoforma  $\beta$  (che è invece codificata da 7-9 geni). Queste famiglie geniche sono state caratterizzate in poche specie vegetali. In *Arabidopsis*, sono presenti 6 geni per la  $\alpha$ -tubulina (Kopczak et al., 1992) e 9 geni per la  $\beta$ -tubulina (Snustad et al., 1992). Questi geni non

\* Università di Siena, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"

sono espressi in maniera uniforme nella pianta, ma mostrano un differente schema di espressione in rapporto ai vari tessuti. La forma  $\alpha 1$  è presente solo nei fiori, mentre le forme  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$  sono espresse in maniera uniforme nelle radici, nelle foglie e nei fiori. La forma  $\alpha 5$  è soprattutto espressa nei fiori, mentre la forma  $\alpha 6$  è espressa a deboli livelli nei vari tessuti. La stessa variabilità si riscontra per le forme  $\beta$ . La  $\beta 1$  è espressa soprattutto nelle radici, come la  $\beta 5$ ; al contrario, la forma  $\beta 2$  si trova principalmente nelle radici e nei fiori così come la forma  $\beta 3$ ; la  $\beta 5$  è prevalente nei fiori, la  $\beta 6$  invece si trova nelle foglie, così come  $\beta 8$  e  $\beta 9$ . Durante lo sviluppo delle foglie di orzo, i geni TuA2 (codificante per una tubulina  $\alpha 3$ ) e TuA4 sono principalmente espressi nei meristemi mentre il gene TuA3 è espresso durante il processo di morfogenesi cellulare e i geni TuA5 e TuA1 sono espressi nelle cellule post-mitotiche (Schroder et al., 2001). Un altro esempio ben conosciuto è rappresentato dal riso. Il gene TubA1 (codificante per la tubulina  $\alpha 1$  in questa specie) si accumula prima della fioritura così come il gene TubA2, mentre il gene TubA3 è molto abbondante durante il processo di antesi. È stato anche dimostrato che l'espressione delle varie isoforme di  $\alpha$ -tubulina è regolata dagli ormoni: le forme TubA1 e TubA2 non sono regolate dall'ormone auxina, mentre i livelli della forma TubA3 sono molto stimolati nei coleottili trattati con auxina (Qin et al., 1997). Un tratto abbastanza comune alle analisi genetiche condotte in piante differenti è la presenza di un gene codificante per una  $\alpha$ -tubulina specificatamente espressa negli stadi tardivi dello sviluppo florale (solitamente nel polline); questo è stato dimostrato in *Camellia sinensis* (Fang et al., 2006) e in *Arabidopsis* (Carpenter et al., 1992). Anche se la somiglianza tra le sequenze geniche delle tubuline di una specie è notevole, ogni pianta generalmente utilizza diversi set di tubuline durante il proprio sviluppo. Il motivo di tale scelta è poco nota, ma sicuramente importante. Infatti, uno sviluppo alterato delle piante è spesso caratterizzato da disturbi nel bilanciamento della quantità e tipo dei monomeri o dimeri di tubulina. Inoltre, la riduzione dell'espressione di specifici geni della tubulina può causare notevoli alterazioni nella morfologia delle radici e nella direzionalità della loro crescita (Mathur & Hülskamp, 2002). Inoltre, geni specifici della tubulina  $\beta$  sono sicuramente coinvolti nel determinare l'orientamento delle fibrille di cellulosa nelle pareti cellulari; di conseguenza, l'angolo delle microfibrille di cellulosa è fortemente correlato con l'espressione specifica di geni della tubulina (Spokevicius et al., 2007). Nei casi in cui l'analisi genetica non sia possibile a causa della mancanza di sequenze, l'analisi della distribuzione d'isotipi nei vari tessuti è stata eseguita utilizzando anticorpi specifici diretti contro le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Per esempio, nel cotone sono state identificate 9 isoforme di  $\alpha$ -tubulina e



7 isoforme di  $\beta$ -tubulina mediante immunoblot dopo elettroforesi 2-D (Dixon et al., 1994). Questi pochi ma significativi dati dimostrano l'importanza dell'espressione di geni specifici della tubulina nel mantenere il corretto sviluppo morfogenetico delle piante.

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una pianta arbustiva rampicante della famiglia delle Vitacee che, per crescere, si attacca a dei sostegni (tutori) mediante i viticci o pampini; si tratta di una pianta perenne a fusto legnoso che produce uno dei frutti più economicamente importanti al mondo, l'uva, utilizzata sia per l'alimentazione sia principalmente per la produzione di vino. Alla luce della sua importanza economica, il genoma della vite è stato recentemente sequenziato (Jaillon et al., 2007). Lo sviluppo del fiore rappresenta un aspetto fondamentale nel ciclo vitale delle piante, e ovviamente anche nella vite rappresenta un punto critico poiché l'ovario si trasformerà nel frutto (il prodotto maggiormente importante da un punto di vista economico commerciale). La specie *Vitis Vinifera* è responsabile della produzione di uva e la resa in termini di frutti può essere molto variabile da anno ad anno, in dipendenza di diversi fattori (climatici, ambientali, ecc.). Risulta quindi evidente e importante comprendere il processo di fioritura della vite allo scopo di ottimizzare la produzione dei frutti. Il modello di fioritura studiato in *Arabidopsis* potrebbe non applicarsi correttamente alla vite (Quesada et al., 2005). È pertanto necessario descrivere correttamente il processo di sviluppo del fiore direttamente nella vite (Boss et al., 2003). Da un punto di vista morfologico, lo sviluppo del fiore della vite è caratterizzato dalla presenza di strutture meristematiche riproduttive e vegetative sullo stesso pezzo di fusto. Questa è una differenza fondamentale rispetto, per esempio, ad *Arabidopsis* nel quale i meristemi vegetativi sono dirottati verso una fase riproduttiva in seguito a stimoli ambientali.

Una gemma cresce producendo un primordio fogliare laterale che quindi si sviluppa in una foglia. Questo processo si ripete normalmente per almeno tre volte, dopo di che il meristema apicale ha la capacità di produrre due tipi di primordi: un successivo primordio fogliare e un primordio indifferenziato che potrà avere due destini differenti. Secondo le condizioni ambientali e la posizione del ramo nel corpo della pianta, il primordio indifferenziato potrà evolvere formando un fiore oppure un viticcio. I primordi indifferenziati sono strutture essenziali per lo sviluppo dell'infiorescenza e per l'architettura complessiva della pianta stessa (fig. 1).

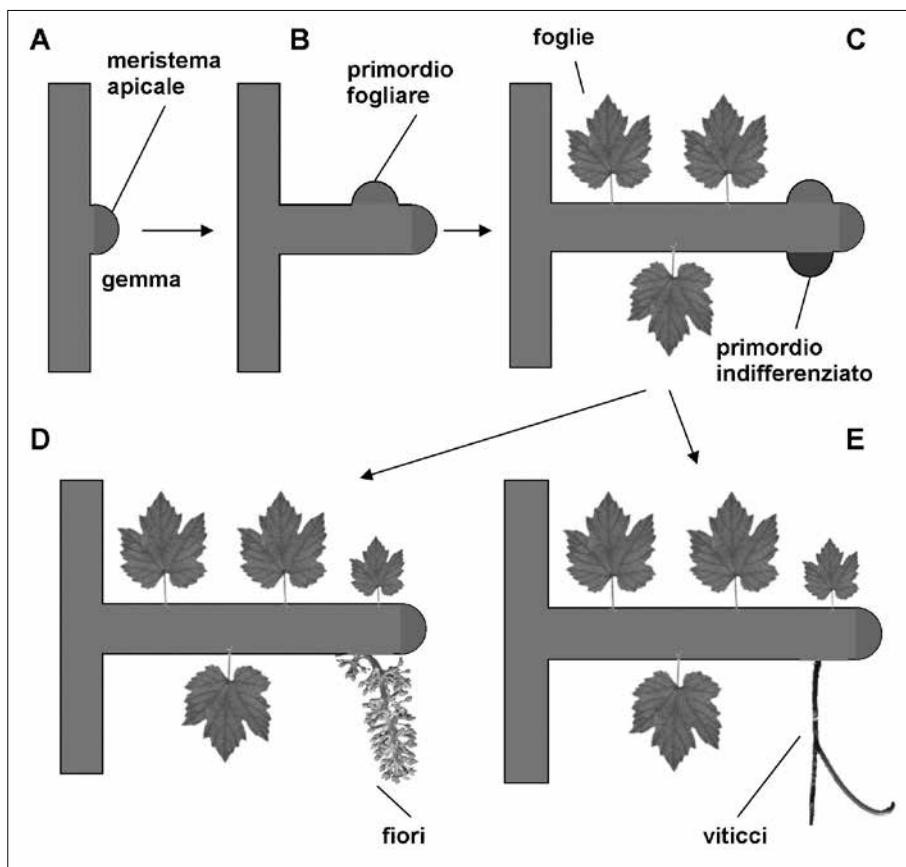


Fig. 1 Schema della formazione di fiori, foglie e viticci nella vite. Nel disegno è riportata la gemma iniziale con il meristema apicale (A), il primordio fogliare (che origina le foglie) (B), il primordio indifferenziato (C), che a sua volta può produrre fiori (D) oppure i viticci (E). I vari elementi non sono stati disegnati in scala

Allo scopo di monitorare i cambiamenti nell'espressione delle isoforme di tubulina durante lo sviluppo delle gemme nelle strutture vegetative o riproduttive nella vite, abbiamo utilizzato un approccio di tipo proteomico, basato su estrazione standardizzata di proteine da differenti organi, seguito dalla separazione delle proteine in elettroforesi bidimensionale in combinazione con lo screening mediante anticorpi commerciali, per identificare le varie isoforme di tubulina in determinati organi della vite. Oltre a un approccio proteomico, abbiamo anche utilizzato un approccio genetico, fondato sull'annotazione bioinformatica dei geni di  $\alpha$ - e  $\beta$ - tubulina allo scopo di identificare i geni putativi presenti nel genoma della vite. L'annotazione bioinformatica

ha lo scopo di ottenere le sequenze dei geni da confrontare successivamente con quelle ottenute dal sequenziamento degli spot proteici ottenuti con l'approccio proteomico.

#### APPROCCIO SPERIMENTALE

Gli anticorpi rivolti contro la  $\alpha$  tubulina usati nel lavoro sono i seguenti: **B-5-1-2** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:5,000,) **Yol 1/34** (monoclonale di ratto, Chemicon Int., diluito 1:500-1000), **TU-01** (monoclonale di topo, ZYMED Laboratories, diluito 1:250-500), **aN-18** (policlonale di capra, SantaCruz Biotechnology, diluito 1:500-1000), **TUB-1A2** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:500-1000) **6-11B-1** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:2000), **DM-1A** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:500-1000), **ATN-02** (policlonale di pecora, Cytoskeleton, diluito 1:500-1000). Gli anticorpi utilizzati per la isoforma  $\beta$  sono: **aE-14** (policlonale di capra, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:500), **TU-06** (monoclonale di topo, Monosan, diluito 1:300), **TUB 2.1** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:450), **aN-18** (policlonale di capra, SantaCruz Biotechnology, diluito 1:100-1000), **D66** (monoclonale di topo, Sigma-Aldrich, diluito 1:250), **TU-13** (monoclonale di topo, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100), **aC-18** (policlonale di capra, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:250), **aF-14** (policlonale di pecora, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:250), **T3526** (intero siero, Sigma-Aldrich, diluito 1:500). Gli anticorpi secondari, coniugati con perossidasi di "horseradish" (*Amoracia rusticana*) (HRP) e utilizzati in immunoblotting per l'analisi delle  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubuline sono: **Anti-topo** dalla GE HealthCare (B-5-1-2, DM1A, 6-11-B-1, TU01, TUB-1A2) utilizzato alla diluizione di 1:5000, **Anti-topo** prodotto dalla ZYMED (D66, Tu-13, TUB 2.1, Tu-06) alla diluizione di 1:5000, **Anti-ratto** prodotto dalla Chemicon International (Yol 1/34) utilizzato alla diluizione di 1:5000, **Anti-pecora** dalla Cytoskeleton (ATN-02) diluito 1:10000, **Anti-capra** dalla SantaCruz Biotechnology (aN-18, aE-14, aC-18, aF-14) con una diluizione di 1:5000, **Anti-coniglio** prodotto dalla GE HealthCare (T-3526) usato alla diluizione di 1:3000.

Allo scopo di ottenere un estratto proteico quantitativamente e qualitativamente idoneo alle successive analisi elettroforetiche sia in monodimensionale sia in bidimensionale, il materiale vegetale è stato processato utilizzando diversi protocolli, schematizzati in figura 2.

Il metodo alla fine scelto e utilizzato per il lavoro è il "METODO FE-

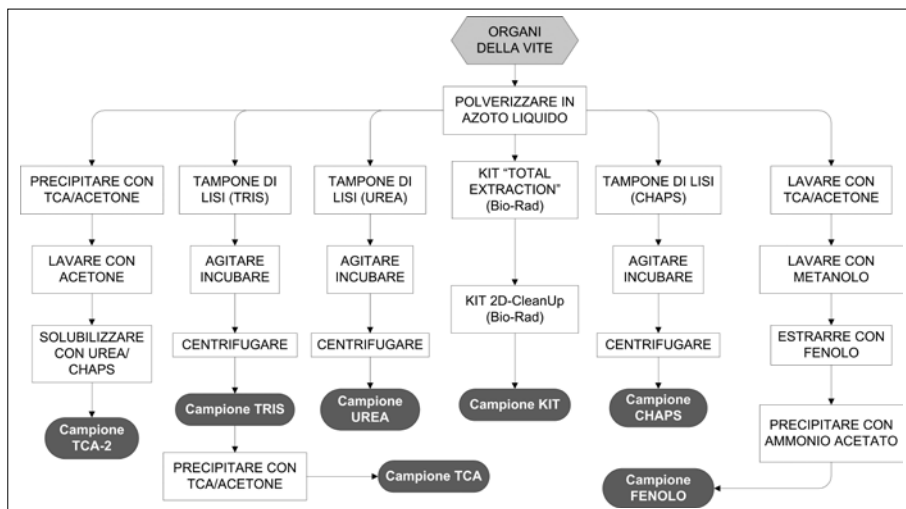


Fig. 2 Schema riassuntivo dei vari processi utilizzati per l'estrazione di proteine da tessuti e organi della vite. Sono riportati schematicamente i punti fondamentali dei protocolli testati per ottimizzare l'estrazione delle proteine dai vari campioni e tessuti presi in considerazione

NOLO", ripreso da un protocollo già pubblicato (Wang et al., 2006). Il primo passaggio nella procedura di estrazione consiste nel congelare i tessuti in azoto liquido e poi nella macinazione dei tessuti (utilizzando mortaio e pestello) fino ad avere una polvere finissima. La polvere è trasferita in tubi da centrifuga a cui sono aggiunti 20 ml di 10% TCA, 50 mM DTT in acetone freddo; dopo agitazione con vortex, il campione è centrifugato a 16000 g per 3 minuti a 4°C e il sopranatante è scartato. Il pellet è quindi lavato con 20 ml di 80% acetone (freddo) contenente 50 mM DTT, (agitando al vortex) e poi centrifugato a 16000 g per 3 minuti a 4°C. Il sopranatante è scartato e il pellet fatto asciugare all'aria per 30 minuti. A questo punto si aggiunge fenolo (pH 8) e il "tampone SDS" (2% SDS, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 5% 2-mercaptoetanolo, 30% saccarosio) in parti uguali (solitamente 6+6 ml). Dopo aver agitato vigorosamente con il vortex, il campione è incubato per 10 minuti. Dopo una successiva centrifugazione a 16000 g per 3 minuti, la parte fenolica superiore (circa 5 ml) è trasferita in un nuovo tubo a cui si aggiunge 25 ml di 0,1 M ammonio acetato in 80% metanolo. Dopo agitazione con vortex, il campione è incubato a -20°C per almeno 2 ore, quindi centrifugato a 16000 g per 5 minuti a 4°C, scartando il sopranatante. Il pellet è lavato con 20 ml di 100% metanolo e quindi con 80% acetone + 50 mM DTT, centrifugando dopo ogni passaggio a 16000 g per 3 minuti. Il pellet finale (denominato FENOLO) è lasciato asciugare all'aria, quindi dissolto nel tampone di reidra-

tazione/solubilizzazione per 2-D oppure nel tampone per l'elettroforesi 1-D.

Il calcolo della concentrazione proteica dei campioni estratti è stato eseguito tramite l'uso di un kit commerciale (*2-D Quant Kit* della GE Healthcare) e con l'ausilio di uno spettrofotometro.

La separazione delle proteine per mezzo di elettroforesi 1-D è stata effettuata su gel di poliacrilammide come descritto da Laemmli (1970). Il "separation gel" è stato allestito utilizzando una cella Mini PROTEAN II della Bio-Rad con spaziatori da 0,75 mm oppure da 1 mm (per gel 2-D), utilizzando pettini da 10 pozzetti oppure con un pozzetto unico (gel a tutto "slab"); i gel sono stati preparati alla concentrazione del 10%.

L'elettroforesi bidimensionale delle proteine è stata effettuata con il seguente protocollo. Le IPG strip (Immobiline Dry Strip della GE Healthcare) con gradiente di pH 4-7, 11 cm di lunghezza, sono state fatte reidrattare in una soluzione contenente il tampone di reidratazione/solubilizzazione (40 mM Tris, 8 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, bromofenolo blu in tracce), cui sono stati aggiunti 18 mM DTT e IPG Buffer pH 4-7 (20 µl/ml). Il tampone di reidratazione/solubilizzazione conteneva anche i campioni proteici da analizzare, la cui concentrazione era stata aggiustata a 1,5 mg/ml in modo da poter caricare 300 µg di proteine nelle strip. Le strip sono state reidratate overnight in un apposito contenitore (Immobiline Dry Strip Reswelling Tray della GE) e sono state ricoperte con il PlusOne Dry Strip Cover Fluid. Dopo la reidratazione, la corsa della prima dimensione è stata effettuata su una piastra raffreddata (Multiphor II della GE), tramite l'utilizzo dell'alimentatore EPS 3500 XL (della GE), usando il seguente schema: 1 minuto a 300 V, 1 ora e 30 minuti con un gradiente lineare da 300 a 3500 V e infine 3 ore e 30 minuti a 3500 V costanti. Al termine della corsa le strip sono state prelevate e conservate a -80°C. Per la seconda dimensione dell'elettroforesi 2-D, le strip sono state equilibrate per 15 minuti nel "equilibration buffer" (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, bromofenolo blu in tracce, 10 mg/ml DTT). Sono stati utilizzati gel "precast" (Criterion Tris-HCl Pre-Cast Gel, 10%, 11 cm, Bio-Rad), su cui sono state poggiate le strip ottenute dalla prima dimensione, bloccandole nella corretta posizione con agarosio. La corsa elettroforetica è stata eseguita con la Criterion Cell (Bio-Rad) a 200 V costanti.

I gel sono stati colorati con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) e le loro immagini sono state acquisite con il Fluor-S. In alternativa, le proteine nei gel sono state trasferite su nitrocellulosa utilizzando la Mini Trans-Blot Cell e la Criterion Blotter della Bio-Rad. Il tampone di trasferimento è stato preparato secondo il protocollo di Towbin et al. (1979), usando membrane di nitro-

cellulosa della Bio-Rad oppure della GE Healthcare. Il trasferimento delle proteine è stato eseguito a 100 V costanti, 350 mA, 200 W per 1 ora, usando l'alimentatore EPS 601 della GE Healthcare. La qualità del trasferimento proteico è stata valutata sia colorando le membrane con Ponceau S sia verificando il trasferimento corretto di standard precolorati Precision (Bio-Rad). Le membrane sono state in seguito bloccate per tutta una notte nella soluzione di bloccaggio costituita da 5% ECL Blocking agent della GE in TBS (20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl) e 0,1% Tween-20. Dopo un breve lavaggio in TBS, la membrana è stata incubata per un'ora con gli anticorpi primari (vedi elenco relativo), diluiti in una soluzione di TBS-T (TBS contenente 0,1% Tween-20). Dopo avere eseguito 3 lavaggi con 20 ml di TBS, la membrana è stata posta a incubare per un'ora con gli anticorpi secondari (vedi elenco relativo). Al termine dell'incubazione, abbiamo sottoposto la membrana a una nuova serie di lavaggi e quindi è stata aggiunta la miscela "ECL Plus Western Blotting Detection Reagents" (GE Healthcare) incubando la membrana per 5 minuti. Il segnale è stato quindi rilevato tramite il Fluor-S Multi-Imager della Bio-Rad, utilizzando il software Quantity One.

I gel e i blot sono stati acquisiti e analizzati tramite lo strumento Fluor-S (Bio-Rad) controllato dai software Quantity One e PDQuest (Bio-Rad). L'acquisizione delle immagini è stata ottenuta con il software Quantity One.

L'annotazione bioinformatica dei geni della tubulina è stata eseguita grazie anche alla collaborazione esistente con il centro di ricerca IGA (Istituto di Genomica Applicata) di Udine, uno dei principali attori nel progetto di sequenziamento. Il lavoro è consistito nell'individuare e annotare i probabili geni della tubulina presenti nella vite, prendendo come riferimento i geni di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina presenti nella banca dati del genoma di *Arabidopsis thaliana*, in modo da verificare gli allineamenti che mostravano elevati gradi di omologia con i dati del genoma 12X di vite. L'annotazione bioinformatica dei geni di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina consiste in una comparazione delle sequenze FASTA delle tubuline presenti nella banca dati di una specie modello (*Arabidopsis thaliana*) con il database del genoma della vite tramite Gbrowse (un software che fa parte del progetto GMOD, Generic Model Organism Database, una collezione di software open source per creare e gestire banche dati biologiche di genomi di diverse dimensioni; GBrowse è stato creato per facilitare l'utilizzo degli strumenti di bioinformatica Gmod con l'utilità di navigare, scaricare ed eseguire ricerche sui dati genomici annotati, [http://gmod.org/wiki/Main\\_Page](http://gmod.org/wiki/Main_Page)). La prima operazione è stata di scaricare le sequenze delle tubuline di *Arabidopsis* (6 sequenze di  $\alpha$  e 9 sequenze di  $\beta$ ); dopo tale operazione è stato effettuato un *tblastn* (Basic Local Alignment Search Tool; *tblastn* identifica la

ricerca nel database di nucleotidi tradotti usando una query proteica) sul genoma 12X di vite. Ciò ha permesso di identificare circa 120 allineamenti possibili di sequenza, segnando il comando di Low complexity. Gli allineamenti ritrovati sono stati analizzati riportando su GBrowse (Vitis 12X Annotation FINAL) le coordinate cromosomiche corrispondenti ai singoli allineamenti e verificando la presenza di geni predetti tramite GAZE GENE PREDICTIONS (Howe et al., 2002). Dopo aver identificato i geni presenti negli allineamenti migliori, è stata scaricata la sequenza genomica dei geni ritrovati ed effettuato un *blastx* (ricerca in database proteici usando una query di nucleotide tradotto) sui database proteici disponibili online su NCBI, in modo da verificare se gli allineamenti identificati potessero corrispondere a tubuline già annotate su altre specie di piante. Gli allineamenti sono stati scelti in base a 3 parametri fondamentali: valore di E-value; superiore in negativo a un valore soglia di  $E \cdot 10^{-60}$ , % di identità, numero di amminoacidi allineati. Prendendo in considerazione gli allineamenti che avevano prodotto un risultato adeguato, in base ai criteri sopraindicati, è stata verificata la presenza di geni annotati in Gbrowse. A questo punto è stata effettuata un'analisi di *Multiblast* con tutte le sequenze di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina tramite Multi-Lagan (<http://genome.lbl.gov/vista/lagan/submit.shtml>), un software che consente un allineamento di sequenze intere. Un ulteriore controllo è consistito nell'analisi di predizione genica *ex novo* dei geni di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, tramite Genescan e Softberry; le sequenze amminoacidiche ottenute con Genescan e Softberry sono state poi "blastate" su NCBI e in modo da verificare se tali sequenze corrispondessero effettivamente a tubuline.

## RISULTATI

Allo scopo di ottimizzare l'estrazione delle proteine dai diversi organi e tessuti della vite in termini di qualità, quantità e riproducibilità abbiamo testato differenti protocolli. La vite è una specie vegetale non semplice da utilizzare come sorgente di proteine. L'alto contenuto in molecole contaminanti (soprattutto in polifenoli) genera, come conseguenza, difficoltà tecniche che limitano la quantità e la qualità delle proteine estratte. Pertanto il primo passaggio è consistito nell'ottimizzazione del protocollo estrattivo, cercando di ottenere una metodica che fosse al tempo stesso qualitativamente e quantitativamente valida e riproducibile sui diversi campioni che sarebbero stati poi analizzati. Sono stati quindi testati sette metodi diversi, alcuni molto semplici, altri lievemente più complessi.

Il primo metodo testato è stato quello definito come “UREA”. Tale metodo si basa su un protocollo pubblicato (Castro et al., 2005), già utilizzato per l’analisi di proteine di vite mediante elettroforesi 2-D. Anche se i dati pubblicati evidenziavano un buon livello di estrazione, nel nostro caso tale metodo non ha fornito risultati soddisfacenti. Il secondo metodo utilizzato è quello definito come “TCA”. In tal caso, i tessuti sono stati inizialmente estratti mediante un tampone solubile e poi la componente proteica è stata precipitata mediante aggiunta di TCA. Anche in questo caso, l’elettroforesi 1-D non ha evidenziato risultati soddisfacenti. Anche il corrispondente immunoblotting con l’anticorpo policlonale non ha dato risultati. Il terzo metodo testato è quello definito come “KIT”. Tale metodo fa uso di due specifici kit commerciali: il primo kit serve per l’estrazione delle proteine, il secondo per la pulizia del campione. La combinazione dei due kit ha permesso di ottenere un campione giudicato di buona qualità, anche se ancora contaminato da sostanze interferenti. Purtroppo l’immunoblotting con l’anticorpo policlonale non ha dato esiti particolarmente positivi. In seguito abbiamo testato il metodo “FENOLO”, descritto in letteratura (Wang et al., 2006). Questo protocollo è stato il migliore tra quelli analizzati. Il campione sembra abbastanza privo d’interferenti. Inoltre, l’analisi per immunoblotting ha fornito risultati positivi, con una banda evidente sotto lo standard di 50 kD. Anche se i dati ottenuti evidenziavano la possibilità di avere un buon metodo, abbiamo continuato la ricerca testando altri tre metodi supplementari. Il primo è il metodo “TRIS”, che fa uso esclusivamente di un tampone solubile ed è abbastanza simile a protocolli commerciali. Questo protocollo si è però rivelato il peggiore in assoluto. Il metodo CHAPS è sostanzialmente simile a quello precedente ma il tampone include anche il detergente CHAPS. La presenza del detergente ha l’effetto di migliorare la capacità estrattiva, ma è assente la banda principale a 50 kD. Il terzo metodo testato è stato denominato TCA-2. In questo protocollo, la polvere ottenuta dopo azoto liquido è stata subito aggiunta a una miscela di TCA e acetone. La resa qualitativa del protocollo sembra buona, quasi paragonabile a quella del metodo “FENOLO”. Anche se il metodo è tecnicamente più semplice, non è stato convincente come il metodo “FENOLO”, soprattutto in termini di riproducibilità e di resa quantitativa. Per questa serie di motivi, il metodo “FENOLO” è stato il migliore tra quelli testati. Il metodo è stato quindi utilizzato per estrarre proteine dai vari campioni di vite. Le modifiche apportate al metodo originale sono consistite soprattutto nell’aggiunta di DTT in alcuni dei tamponi utilizzati. Il protocollo “KIT”, anche se adeguato e riproducibile, è stato considerato troppo costoso perché potesse essere utilizzato su un numero elevato di campioni (Parrotta et al., 2010, fig. 1).



Per identificare le varie isoforme di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, sono stati testati diversi anticorpi commerciali. In letteratura (almeno per quanto è conosciuto) non ci sono per adesso dati sull'utilizzo di anticorpi anti-tubulina contro estratti di vite. Gli anticorpi sono stati inizialmente testati contro un estratto di cervello bovino, considerato come standard poiché la maggior parte degli anticorpi disponibili in commercio è prodotta contro tubuline di origine animale. Gli anticorpi contro la  $\alpha$ -tubulina sono stati in seguito testati su un estratto di foglie di tabacco, considerato come pianta di controllo perché in letteratura sono riportati diversi dati sulle isoforme di tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  in tabacco. Solo tre anticorpi per la  $\alpha$ -tubulina hanno mostrato un'adeguata cross-reattività: B-5-1-2, aN-18 e l'anticorpo policlonale ATN-02. Per quanto riguarda la  $\alpha$ -tubulina, solo l'anticorpo B-5-1-2 ha cross-reagito contro le proteine estratte da foglie di vite.

In maniera del tutto simile alle  $\alpha$ -tubuline, anche gli anticorpi commerciali contro le  $\beta$ -tubuline hanno mostrato un cross-reattività debole con i campioni di vite. Come successo per le  $\alpha$ -tubuline, un solo anticorpo è stato positivo; l'aE-14 della Santa Cruz Biotechnology. Nelle nostre ricerche l'anticorpo aE-14 ha cross-reagito anche contro le tubuline di tabacco. I vari anticorpi utilizzati hanno talvolta fornito esiti positivi ma spesso si è trattato di risultati molto deboli e di difficile interpretazione (Parrotta et al., 2010, fig. 2, C,D,E,F). Una volta terminata la selezione degli anticorpi, si è proceduto alla standardizzazione delle procedure di elettroforesi 2-D e del successivo immunoblotting usando i gel 10% Criterion Tris-HCl (Bio-Rad). Questo tipo di gel commerciali garantisce la possibilità di usare strip più lunghe per la prima dimensione e inoltre si tratta di gel di cui il venditore assicura l'alta riproducibilità in termini di risultati.

Lo scopo principale di questo lavoro era la caratterizzazione delle isoforme di  $\alpha$ - e di  $\beta$ -tubulina espresse durante lo sviluppo delle gemme verso le foglie, i fiori e i viticci in *Vitis vinifera*. Si tratta di organi chiaramente differenti, caratterizzati da cellule e tessuti con struttura e funzioni molto diverse. I suddetti stadi sono stati quindi considerati come punti terminali della linea di sviluppo della pianta. Poiché i suddetti organi contengono cellule diverse, a loro volta caratterizzate da apparati microtubulari differenti, era possibile attendersi una diversità nella composizione in tubuline. Era anche chiaro che organi differenti potessero contenere livelli disuguali di tubulina; quindi per standardizzare le analisi è stato deciso di tenere costante la quantità proteica globale dei diversi campioni. Come hanno mostrato le analisi dei blot, le subunità di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina hanno un punto isoelettrico intorno a 4.8-5, con una media di peso molecolare molto prossima a 50 kD. Le isoforme  $\alpha$  migra-

no più velocemente durante la seconda dimensione dell'elettroforesi (SDS-PAGE) e sono leggermente meno acide nella prima dimensione (IEF) rispetto alle isoforme  $\beta$ . Sia le isoforme  $\alpha$  sia quelle  $\beta$  sono focalizzate in singoli cluster distinti durante la focalizzazione isoelettrica.

Abbiamo identificato un massimo di otto isoforme di  $\alpha$ -tubulina nei tessuti esaminati, che sono state numerate in base alla loro posizione (dallo spot più acido a quello più basico). Le isoforme  $\alpha$  della tubulina mostrano un accumulo differente nei diversi stadi di sviluppo. Le isoforme 3-7 sono presenti durante tutti gli stadi di sviluppo, sebbene con differenti proporzioni. Al contrario, le isoforme 1 e 2 sono difficilmente rilevabili nelle gemme piccole, ma sono presenti in tutti gli altri stadi presi in considerazione; l'isoforma 8 è stata trovata negli stadi iniziali di sviluppo (da gemme piccole a gemme parzialmente aperte), a volte anche nelle foglie, ma non in viticci e fiori. Le isoforme 4 e 5 sono le più abbondanti nelle fasi iniziali di sviluppo e nelle foglie. Al contrario, viticci e fiori mostrano una differente proporzione delle isoforme; le isoforme più basiche (da 4 a 7) sono usate abbondantemente nei viticci e nei fiori mentre le isoforme acide (da 1 a 3) sono usate meno frequentemente. Quando abbiamo confrontato gli stadi iniziali, le gemme piccole erano caratterizzate da un basso numero d'isoforme (principalmente 3-5); altre isoforme erano assenti (come le isoforme 1-2) oppure erano espresse a bassi livelli (isoforme 6-8). Il range delle isoforme utilizzate aumenta durante il periodo di transizione da gemme piccole a grandi o parzialmente aperte, dove tutte le isoforme sono rappresentate. La variazione d'intensità tra isoforme in ogni campione era meno evidente. I successivi stadi di sviluppo presentano un evidente cambiamento nella composizione delle isoforme. Lo stadio di sviluppo delle foglie è caratterizzato da un uso prevalente d'isoforme acide (2-4) con le altre isoforme espresse a livelli più bassi. Viticci e fiori mostrano una peculiare composizione d'isoforme, con quelle basiche (5-7) maggiormente abbondanti mentre le isoforme acide (1-3) sono rilevabili solo a bassi livelli. Come tendenza generale, lo stadio delle gemme è caratterizzato dalla progressiva comparsa di tutte le isoforme di  $\alpha$ -tubulina mentre gli stadi finali di sviluppo sono caratterizzati dalla presenza delle isoforme 1-7, con quelle acide usate prevalentemente nelle foglie e quelle basiche usate abbondantemente in viticci e fiori. Le isoforme acide (1-3) non sono mai usate in grandi quantità, mentre le isoforme centrali e quelle basiche sono usate in quantità maggiori (Parrotta et al., 2010, fig. 5).

Per quanto riguarda le isoforme  $\beta$  della tubulina abbiamo trovato un massimo di sette isoforme nei campioni analizzati e, come già fatto per le isoforme  $\alpha$ , abbiamo numerato gli spot da quello più acido a quello più basico. La comparazione tra le isoforme  $\beta$  della tubulina da gemme piccole a foglie/fiori/

viticci ha indicato che le  $\beta$ -tubuline hanno una differente espressione durante le fasi di sviluppo. L'isoforma 1 è difficilmente riscontrata in tutti i campioni, essendo un debole segnale rilevato solo nelle gemme grandi; la presenza di questa isoforma in altri campioni è rara e difficile da apprezzare. Un comportamento simile all'isoforma 1 si riscontra anche per l'isoforma più basica, la numero 7, la quale è difficilmente rilevabile, tranne nelle foglie dove pertanto rappresenta un marcatore specifico per quest'organo. Le isoforme 2 e 3 sono state trovate costantemente nelle prime fasi di sviluppo (gemme piccole) e, data la loro abbondanza in quest'organo, sono state considerate specifiche per la fase iniziale di sviluppo delle gemme. La transizione da gemme piccole a gemme grandi è contrassegnata dalla progressiva diminuzione dell'isoforma 2 e dalla concomitante comparsa delle isoforme 4 e 5, che rappresentano le isoforme più abbondanti nei restanti campioni. L'isoforma 3 aumenta in modo specifico nelle gemme grandi, anche se si ritrova nelle foglie, mentre è difficilmente rilevabile in gemme parzialmente aperte, fiori e viticci. L'isoforma 4 è stata ritrovata in tutti i campioni, leggermente in gemme piccole e in gemme parzialmente aperte, ma abbondantemente in gemme grandi, foglie, fiori e viticci. Data quest'abbondante presenza in fiori e viticci, l'isoforma 4 può essere considerata come un prezioso marcatore per questi due organi. In maniera del tutto simile all'isoforma 4, la isoforma 5 è poco concentrata in gemme piccole, ma molto abbondante in tutti gli altri campioni; molto interessante risulta essere la diminuzione della concentrazione della isoforma 5 che, altamente espressa in gemme parzialmente aperte, diminuisce con lo sviluppo verso le fasi finali (foglie, fiori e viticci). In una più evidente contrapposizione, l'isoforma 6 è usata in tutti i campioni esaminati a livelli veramente bassi. Sebbene tale isoforma sia presente nelle fasi iniziali (gemme piccole e gemme grandi), non è stata trovata nelle gemme aperte; anche se raramente può essere presente nelle foglie, essa non è mai stata trovata in viticci e fiori e, di conseguenza, l'isoforma 6 denota le iniziali fasi di sviluppo delle gemme. L'isoforma 7 è stata trovata in maniera più consistente solo nelle foglie, suggerendo che essa possa essere un marcatore specifico per questa fase dello sviluppo. Pertanto, le isoforme 4 e 5 sono le uniche presenti in tutti gli stadi di sviluppo presi in considerazione. Le gemme piccole sono caratterizzate da una composizione unica in isoforme, mentre le gemme grandi e le foglie sono molto simili nel pattern di espressione delle  $\beta$ -tubuline. Viceversa, le gemme aperte, viticci e fiori sembravano usare distinti pattern di espressione delle isoforme di  $\beta$ -tubulina (4 e 5), anche se con una diversa concentrazione relativa. Le gemme parzialmente aperte sono contrassegnate da un utilizzo consistente dell'isoforma 5, mentre i viticci e i fiori usano prevalentemente la

| NUM. | GENE              | CROMOSOMA | POSIZIONE                 |
|------|-------------------|-----------|---------------------------|
| 1    | GSVIVT00025462001 | chr 6     | chr6:667793..670977       |
| 2    | GSVIVT00009258001 | chr 18    | chr18:6747258..6749654    |
| 3    | GSVIVT00011382001 | chr 14    | chr14:29211247..29212827  |
| 4    | GSVIVT00006470001 | chr Un    | chrUn:26252366..26255269  |
| 5    | GSVIVT00033415001 | chr 8     | chr8:20881505..20884053   |
| 6    | GSVIVT00037046001 | chr 3     | chr3:8412114..8414458     |
| 7    | GSVIVT00004414001 | chrUn     | chrUn: 38530310..38532380 |

Tab. 1

| NUM. | GENE              | CROMOSOMA | POSIZIONE                |
|------|-------------------|-----------|--------------------------|
| 1    | GSVIVT00008426001 | chr 17    | chr17:2199755..2201874   |
| 2    | GSVIVT00019775001 | chr 2     | chr2:3205706..3208737    |
| 3    | GSVIVT00021707001 | chr 10    | chr10:9832350..9836904   |
| 4    | GSVIVT00037405001 | chr 6     | chr6:14279802..14282041  |
| 5    | GSVIVT00028941001 | chr 16    | chr16:17206674..17208766 |
| 6    | GSVIVT00009913001 | chr 18    | chr18:12336995..12339223 |
| 7    | GSVIVT00024825001 | chr 6     | chr6:6589718..6591552    |
| 8    | GSVIVT00025778001 | chr 8     | chr8:11972941..11975961  |
| 9    | GSVIVT00019758001 | chr 2     | chr2:3047617..3049167    |

Tab. 2

isoforma 4 in ampie proporzioni. L'esposizione prolungata dei blot di viticci e fiori hanno confermato la bassa abbondanza dell'isoforma 3 in viticci, mentre nessun'altra isoforma è presente nei fiori oltre alle isoforme 4 e 5, suggerendo che, se esistono ulteriori isoforme di tubulina, sono espresse in maniera molto bassa in viticci e fiori (Parrotta et al., 2010, fig. 6).

Il processo di annotazione bioinformatica ci ha permesso di identificare una serie di geni ipoteticamente presenti nel genoma della vite. Tramite comparazione con i geni di  $\alpha$ - e  $\beta$  tubulina di *Arabidopsis thaliana*, abbiamo identificato nella tabella 1 i geni per le isoforme  $\alpha$ .

Nella tabella 2 è riportata la lista dei geni per la  $\beta$ -tubulina.

L'identificazione dei geni tramite analisi bioinformatica ci ha confortato sul numero dei possibili geni per le tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  ma ha messo in evidenza la necessità di sequenziare gli spot proteici identificati negli anni precedenti tramite approcci proteomici, allo scopo di determinare esattamente l'identità di tali isoforme e per comprendere quali isoforme derivino dall'espressione di geni specifici e quali invece siano il risultato di modificazioni post-traduzionali.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

A differenza delle cellule animali, l'estrazione di proteine da tessuti vegetali non è tecnicamente semplice. Barriere fisiche (parete cellulare) e molecole interferenti (polifenoli, terpeni, acidi organici, pectine, pigmenti, cere, ...) costituiscono un ostacolo sia alla capacità estrattiva sia alla corretta analisi delle proteine mediante elettroforesi 2-D. Per ovviare a questo inconveniente, si è reso quindi necessario ottimizzare il protocollo di estrazione in modo tale da avere a disposizione un metodo che permettesse di ottenere un adeguato quantitativo proteico da tessuti differenti e di qualità appropriata per una buona analisi proteomica. Dopo aver testato differenti protocolli di estrazione, solo uno ha fornito risultati soddisfacenti (metodo FENOLO). Il metodo si basa sulla rimozione preliminare dei contaminanti mediante lavaggi con solventi organici e nella successiva estrazione delle proteine con fenolo (Wang et al., 2006). Questo protocollo è stato utilizzato con ottimi risultati anche in diverse piante "difficili", tra cui l'olivo (Wang et al., 2003). Il pellet proteico finale è stato risospeso in un tampone di reidratazione/solubilizzazione standard; altri autori hanno ottenuto risultati soddisfacenti utilizzando tamponi diversi, arricchiti in detergenti e agenti caotropici (Mechin et al., 2003). Il protocollo FENOLO è stato utilizzato con successo anche per estrarre proteine da foglie di tabacco e di *Arabidopsis* (usati come controllo nella presente tesi) e anche per estrarre proteine da licheni (Nicolardi et al., 2007). Se paragonato con altri metodi utilizzati per l'estrazione di proteine da tessuti della vite (Castro et al., 2005; Vincent et al., 2007), questo metodo sembra garantire rese paragonabili, una maggiore riproducibilità e "semplicità" tecnica.

Per identificare le varie isoforme di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina abbiamo provveduto alla selezione di diversi anticorpi dalle principali aziende commerciali, diretti sia contro la subunità  $\alpha$  sia contro quella  $\beta$ . Per quanto riguarda la  $\alpha$ -tubulina, solo un anticorpo (B-5-1-2) ha cross-reagito contro le proteine estratte da foglie di vite. Quest'anticorpo riconosce la tubulina in organismi evolutivamente divergenti, come bue, tabacco e *Arabidopsis*. In accordo con le istruzioni tecniche allegate, l'anticorpo B-5-1-2 è diretto contro i filamenti sarkosil-resistenti di riccio di mare; in particolare l'anticorpo riconosce un epitopo localizzato nella porzione carbossi-terminale della  $\alpha$ -tubulina. Tale anticorpo è già stato utilizzato con successo per localizzare le isoforme di tubulina in *Arabidopsis* (Kopczak et al., 1992) ed è stato giudicato capace di riconoscere tutte le varie isoforme presenti (per lo meno in *Arabidopsis*). Lo stesso anticorpo ha fornito risultati molto importanti anche in segale (Kerr & Carter 1990). È difficile comprendere perché soltanto l'anticorpo B-5-1-2 è stato positivo nell'analisi di estratti

proteici da vite. Possiamo ipotizzare qualche modificazione nella sequenza delle  $\alpha$ -tubuline di vite che le rende diverse rispetto alle altre piante. Anche gli anticorpi commerciali contro le  $\beta$ -tubuline hanno mostrato un cross-reattività debole con i campioni di vite. Come successo per le  $\alpha$ -tubuline, un solo anticorpo è stato positivo; l'aE-14 della Santa Cruz Biotechnology. In accordo con le informazioni tecniche, l'anticorpo cross-reagisce contro un epitopo situato nella porzione N-terminale della  $\beta$ -tubulina di *Arabidopsis thaliana*. Nelle nostre ricerche l'anticorpo aE-14 ha cross-reagito anche contro le tubuline di tabacco. Gli altri anticorpi anti  $\beta$ -tubulina hanno mostrato cross-reazioni deboli o in alcuni casi nessuna cross-reattività.

Gli immunoblot con l'anticorpo B-5-1-2 hanno mostrato che la quantità relativa di tubulina non cambia significativamente tra i differenti tessuti di vite quando il contenuto totale di proteine rimane costante. In altri lavori è stata presa in considerazione la variabilità dell'espressione delle tubuline nei differenti campioni così da normalizzare le differenze quantitative (Dixon et al., 1994), ma nel nostro caso abbiamo preferito tenere costante la quantità di proteina nei diversi campioni presi in considerazione per valutare un'eventuale variazione di quantità delle tubuline. Inoltre, l'alta quantità di tubulina suggerisce che anche le isoforme espresse debolmente sarebbero dovute essere rilevate. Riteniamo che la variabilità dell'espressione di tubuline non sia dipendente da fenomeni di degradazione proteica perché non abbiamo mai rilevato segnali in immunoblot con pesi molecolari più bassi di quello atteso. Inoltre, altri lavori riportano segnali completi di  $\alpha$ -tubulina in campioni proteici estratti con le stesse procedure (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004). Nel caso della vite, le  $\alpha$ -tubuline sono raggruppate in un unico cluster con punto iso-elettrico di 4,8-5. Questo comportamento è diverso da quello osservato nelle fibre di cotone (Dixon et al., 1994) dove le isoforme di  $\alpha$ -tubulina sono aggregate in due distinti cluster, tuttavia il comportamento osservato nella vite è simile a quello osservato in *Arabidopsis* (Kopczak et al., 1992) e nelle radici di segale (Kerr & Carter, 1990) dove le isoforme di  $\alpha$ -tubulina sono aggregate in un cluster singolo. Per quanto riguarda il tabacco, la situazione è intermedia (Smertenko et al., 1997).

Durante lo sviluppo delle foglie, le isoforme più acide di  $\alpha$ -tubulina aumentano in concentrazione relativa rispetto alle isoforme più basiche, suggerendo che le forme più acide sono espresse durante lo sviluppo delle foglie. Le foglie mature mostrano un'attività mitotica inferiore rispetto agli stadi giovanili, crescono a un ritmo minore e richiedono una composizione microtubulare specifica per mantenere la struttura cellulare. Da ciò si può ipotizzare che tubuline specifiche per l'apparato mitotico non sarebbero ulteriormente richieste

ma potrebbero invece essere necessarie tubuline utili per l'interazione con altre strutture cellulari. Al contrario, le gemme sono generalmente caratterizzate da un'intensa attività mitotica e richiedono microtubuli molto dinamici, probabilmente costituiti da tubuline diverse rispetto alle foglie. Un grande numero di  $\alpha$ -tubuline è stato identificato nelle fibre del cotone, da 10 a 20 giorni dall'apertura delle antere (quando la crescita delle fibre è ormai rallentata) (Dixon et al., 1994). Un alto numero d'isoforme di tubulina nei tessuti con frequenti divisioni non è sorprendente perché le cellule con alti tassi di crescita e rapide divisioni hanno generalmente un alto numero d'isoforme di tubulina (Han et al., 1991).

In letteratura, non sono riportati dati sull'espressione proteica di tubulina nei viticci. Maggiori informazioni sono invece disponibili per i fiori, i quali sono spesso caratterizzati da una specifica isoforma di  $\alpha$ -tubulina che si accumula durante lo sviluppo del gametofito maschile. Questa isoforma è probabilmente specifica per l'attività microtubulare dei tubetti pollinici (Carpenter et al., 1992; Evrard et al., 2002; Fang et al., 2006). Le analisi che abbiamo condotto sono state eseguite fino a stadi giovanili dello sviluppo dei fiori, quando il polline non è stato ancora prodotto; tuttavia, non abbiamo identificato isoforme specifiche di  $\alpha$ -tubulina per i fiori. Confrontando foglie, fiori e viticci si osserva un uso prevalente delle isoforme di  $\alpha$ -tubulina più basiche in fiori e viticci, con una prevalenza delle isoforme da 5-7 (al contrario, debolmente rilevate durante lo sviluppo delle gemme). Fiori e viticci sembrano usare anche lo stesso pattern di  $\beta$ -tubuline (isoforme 4 e 5). Questi dati suggeriscono che, sebbene fiori e viticci siano organi molto differenti, usano lo stesso pattern di tubuline  $\alpha$  e  $\beta$ .

Le proteine citoscheletriche non cambiano in maniera considerevole i loro livelli di espressione in differenti cultivar della vite e la loro espressione non è condizionata da stress idrici o salini (Vincent et al., 2007); di conseguenza, le differenze tra la composizione in  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubuline dipende dall'uso differenziale delle proteine piuttosto che dalla risposta a cambiamenti ambientali.

I risultati del nostro lavoro sono in linea con i dati riportati in letteratura indicanti che isoforme specifiche di tubulina sono espresse preferenzialmente in diversi tessuti della pianta. Dato che l'espressione delle isoforme di tubulina è sotto controllo ormonale (Yoshikawa et al., 2003), i geni delle tubuline sarebbero differenzialmente regolati in linea con i programmi di sviluppo, così che le isoforme di tubulina abbiano una specifica funzione durante la crescita e lo sviluppo degli organi della pianta. La recente identificazione dei possibili geni per le tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  fornisce uno strumento potente per analizzare l'espressione differenziale dei geni nei vari tessuti della pianta e per determinare un collegamento tra espressione genica, accumulo di isoforme specifiche e modificazioni

post-traduzionali allo scopo di comprendere come la pianta utilizzi e moduli le varie isoforme di tubulina in rapporto al suo stadio di sviluppo.

#### RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento spetta al Prof. Mario Pezzotti (Dipartimento di Scienze Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino, Università di Verona), al Prof. Enrico Pè (Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa) e al Prof. Luca Bini (Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena) per i suggerimenti e le critiche ricevute durante la preparazione del lavoro. Un ringraziamento sentito va al Prof. Michele Morgante per la sua ospitalità presso i laboratori dell'IGA (Istituto di Genomica Applicata) per il lavoro di annotazione dei geni.

#### RIASSUNTO

I microtubuli svolgono un ruolo importante durante la crescita e la morfogenesi delle cellule vegetali. Differenti isoforme di  $\alpha$ -e  $\beta$ -tubulina si accumulano nelle cellule di piante superiori e hanno origine mediante trascrizione di geni differenti o da modifiche post-traslazionali. L'uso di differenti isoforme di tubulina coinvolge il legame dei microtubuli a diverse proteine associate e genera quindi microtubuli con le organizzazioni e funzioni diverse. Isoforme di tubulina sono differenzialmente espresse in strutture vegetative e riproduttive secondo il programma di sviluppo della pianta. In vite (*Vitis vinifera* L.), strutture vegetative e riproduttive appaiono sulla stessa radice, facendo di questa specie vegetale un modello eccellente per studiare l'accumulo di isoforme di tubulina. Le proteine sono state estratte da campioni vite (gemme, foglie, fiori e viticci) utilizzando un protocollo di estrazione ottimizzato, separate da elettroforesi bidimensionale e analizzate mediante immunoblot con anticorpi anti-tubulina. Abbiamo identificato otto  $\alpha$ -tubulina e sette isoforme  $\beta$ -tubulina con pI circa 4,8-5 che si raggruppano in cluster separati. Abbiamo analizzato il genoma della vite per identificare i geni putativi di tubulina, prendendo come riferimento i geni di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina di *Arabidopsis thaliana*. Confrontando i geni di tubulina di *Arabidopsis* con il genoma della vite 12X, abbiamo identificato un certo numero di geni che corrisponde relativamente al numero di spot identificati da 2-DE.

#### ABSTRACT

Microtubules play important roles during growth and morphogenesis of plant cells. Multiple isoforms of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin accumulate in higher plant cells and originate either by transcription of different genes or by post-translational modifications. The use of dif-



ferent tubulin isoforms involves the binding of microtubules to different associated proteins and therefore generates microtubules with different organizations and functions. Tubulin isoforms are differentially expressed in vegetative and reproductive structures according to the developmental program of plants. In grapevine (*Vitis vinifera* L.), vegetative and reproductive structures appear on the same stem, making this plant species an excellent model to study the accumulation of tubulin isoforms. Proteins were extracted from grapevine samples (buds, leaves, flowers and tendrils) using an optimized extraction protocol, separated by two-dimensional electrophoresis and analyzed by immunoblot with anti-tubulin antibodies. We identified eight  $\alpha$ -tubulin and seven  $\beta$ -tubulin isoforms with pI around 4.8–5 that group into separate clusters. We have analyzed the genome of grapevine to identify putative tubulin genes, taking as reference the  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin genes of *Arabidopsis thaliana*. By comparing the *Arabidopsis* tubulin genes to the 12X grapevine genome, we identified a number of genes which corresponds comparatively to the number of spots identified by 2-DE.

#### CITAZIONI BIBLIOGRAFICHE

- BOSS P.K., BUCKERIDGE E.J., POOLE A., THOMAS M.R. (2003): *New insights into grapevine flowering*, «Functional Plant Biology», 30, pp. 593-606.
- CARPENTER J.L., PLOENSE S.E., SNUSTAD D.P., SILFLOW C.D. (1992): *Preferential expression of an  $\alpha$ -tubulin gene of Arabidopsis in pollen*, «Plant Cell», 4, pp. 557-571.
- CASTRO A.J., CARAPITO C., ZORN N., MAGNE C., LEIZE E., VAN D.A., CLEMENT C. (2005): *Proteomic analysis of grapevine (Vitis vinifera L.) tissues subjected to herbicide stress*, «Journal Experimental Botany», 56, pp. 2783-2795.
- DIXON D.C., SEAGULL R.W., TRIPLETT B.A. (1994): *Changes in the accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isotypes during cotton fiber development*, «Plant Physiology», 105, pp. 1347-1353.
- EVRRARD J.L., NGUYEN I., BERGDOLL M., MUTTERER J., STEINMETZ A., LAMBERT A.M. (2002): *A novel pollen-specific alpha-tubulin in sunflower: structure and characterization*, «Plant Molecular Biology», 49, pp. 611-620.
- FANG W.P., JIANG C.J., YU M., YE A.H., WANG Z.X. (2006): *Differentially expression of *Tua 1*, a tubulin-encoding gene, during flowering of tea plant Camellia sinensis (L.) O. Kuntze using cDNA amplified fragment length polymorphism technique*, «Acta Biochim. Biophys. Sinica», 38, pp. 653-662.
- HAN I.S., JONGEWAARD I., FOSKET D.E. (1991): *Limited expression of a diverged beta-tubulin gene during soybean (Glycine max [L.] Merr.) development*, «Plant Molecular Biology», 16, pp. 225-234.
- HOWE K.L., CHOTHIA T., DURBIN R. (2002): *GAZE: a generic framework for the integration of gene prediction data by dynamic programming*, «Genome research», 12 (9), pp. 1418-1427.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B., POLICRITI A., CLEPET C., CASAGRANDE A., CHOISNE N., AUBOURG S., VITULO N., JUBIN C., VEZZI A., LEGEAI F., HUGUENEY P., DASILVA C., HORNER D., MICA E., JUBLOT D., POULAIN J., BRUYERE C., BILLAULT A., SEGURENS B., GOUYVENOUX M., UGARTE E., CATTONARO F., ANTHOUARD V., VICO V., DEL F.C., ALAUX M., DI G.G., DUMAS V., FELICE N., PAILLARD S., JUMAN I., MOROLDO M., SCALABRIN S., CANAGUIER A., LE CLAINCHE I., MALACRIDA G., DURAND E.,

- PESOLE G., LAUCOU V., CHATELET P., MERDINOGLU D., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., LECHARNY A., SCARPELLI C., ARTIGUENAVE F., PE M.E., VALLE G., MORGANTE M., CABOCHE M., ADAM-BLONDON A.F., WEISSENBAACH J., QUETIER F., WINCKER P. (2007): *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*, «Nature», 449, pp. 463-467.
- KERR G.P., CARTER J.V. (1990): *Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation*, «Plant Physiol.», 93, pp. 83-88.
- KOPCZAK S.D., HAAS N.A., HUSSEY P.J., SILFLOW C.D., SNUSTAD D.P. (1992): *The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed  $\alpha$ -tubulin genes*, «Plant Cell», 4, pp. 539-547.
- LAEMMLI U.K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, «Nature», 227, pp. 680-685.
- MATHUR J., HULSKAMP M. (2002): *Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants*, «Curr Biol», 12, pp. 669-676.
- MECHIN V., CONSOLI L., LE G.M., DAMERVAL C. (2003): *An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients*, «Proteomics», 3, pp. 1299-1302.
- NICK P. (2007): *The plant cytoskeleton: new jobs for a versatile network*, «Protoplasma», 230, pp. 125-127.
- NICOLARDI V. (2007): *Use of higher plant leaves and Evernia prunastri lichens for indirect measure of Hg vapor in the air*, University of Siena. PhD Thesis.
- PARROTTA L., CAI G., CRESTI M. (2010): *Changes in the accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin during bud development in Vitis vinifera L.*, «Planta», 231, pp. 277-291.
- QUESADA V., DEAN C., SIMPSON G.G. (2005): *Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering*, «Int. J. Dev. Biol.», 49, pp. 773-780.
- QIN X., GIANI S., BREVIARIO D. (1997): *Molecular cloning of three rice  $\alpha$ -tubulin isotypes: differential expression in tissues and during flower development*, «Gene Structure and Expression», 1354, pp. 19-23.
- SCHRODER J., STENGER H., WERNICKE W. (2001): *Alpha-tubulin genes are differentially expressed during leaf cell development in barley (Hordeum vulgare L.)*, «Plant Molecular Biology», 45, pp. 723-730.
- SMERTENKO A., BLUME Y., VIKLICKY V., OPATRYN Z., DRABER P. (1997): *Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in Nicotiana tabacum L. cells*, «Planta» 201, pp. 349-358.
- SNUSTAD D.P., HAAS N.A., KOPCZAK S.D., SILFLOW C.D. (1992): *The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes*, «Plant Cell» 4, pp. 549-556.
- SPOKEVICIUS A.V., SOUTHERTON S.G., MACMILLAN C.P., QIU D., GAN S., TIBBITS J.F.G., MORAN G.F., BOSSINGER G. (2007): *Beta-tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls*, «Plant J», 51, pp. 717-726.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J. (1979): *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 76, pp. 4350-4354.
- VINCENT D., ERGUL A., BOHLMAN M.C., TATTERSALL E.A., TILLET R.L., WHEATLEY M.D., WOOLSEY R., QUILICI D.R., JOETS J., SCHLAUCH K., SCHOOLEY D.A., CUSHMAN J.C., CRAMER G.R. (2007): *Proteomic analysis reveals differences between Vitis vinifera L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity*, «J. Exp. Bot.», 58, pp. 1873-1892.
- WANG W., SCALI M., VIGNANI R., SPADAFORA A., SENSI E., MAZZUCA S., CRESTI M. (2003): *Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue*

- containing high levels of interfering compounds*, «Electrophoresis», 24, pp. 2369-2375.
- WANG W., VIGNANI R., SCALI M., SENSI E., CRESTI M. (2004): *Post-translational modifications of  $\alpha$ -tubulin in Zea mays L. are highly tissue specific*, «Planta», 218, pp. 460-465.
- WANG W., VIGNANI R., SCALI M., CRESTI M. (2006): *A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis*, «Electrophoresis», 27, pp. 2782-2786.
- WOOTTON J.C., FEDERHEN S. (1993): *Statistics of local complexity in amino acid sequences and sequence databases*, «Comput. Chem», 17, pp. 149-163.
- YOSHIKAWA M., YANG G., KAWAGUCHI K., KOMATSU S. (2003): *Expression analyses of beta-tubulin isotype genes in rice*, «Plant Cell Physiol.», 44, pp. 1202-1207.



## Apomissia: storia di un carattere rivoluzionario

Nel lontano 1829 i Kew Gardens di Londra ricevettero 3 piante femminili di una specie dioica Australiana della famiglia delle *Euforbiaceae* che fino a quel momento era rimasta sconosciuta. Il 18 Giugno 1839, presso la “Linnean Society of London”, John Smith, primo curatore dei Kew, annunciò che, nonostante le avesse tenute sotto stretto controllo per 10 anni, queste piante producevano seme anche in apparente assenza di polline. Egli affermò: «la mia ricerca di strutture riconducibili a un apparato riproduttivo maschile non ha avuto successo». A quei tempi nessuna pianta, che potesse essere minimamente imparentata con la specie in questione, veniva coltivata presso i Kew Gardens ma, nonostante questo, ogni anno i 3 individui femminili producevano frutti contenenti semi vitali e Smith poté allevare, di anno in anno, progenie “identiche alla pianta madre”. Questa caratteristica peculiare fece sì che a tale specie venisse dato il nome di *Caelebogyne ilicifolia* — da “caelebs, celibe” e “γυνή, donna” — per indicare una «pianta in cui il polline non è essenziale per la formazione del seme». Da quel momento venne avviata una lunga diatriba sulle cause del fenomeno che, solo dopo quasi mezzo secolo, venne identificato con il termine di *apomissia*. In realtà tale termine fu inizialmente utilizzato per indicare, in modo generico, qualunque forma di riproduzione asessuata, compresa la propagazione vegetativa. Solo nel 1984 Nogler fornì quella che ancora oggi è la definizione esatta del termine apomissia: *riproduzione asessuale per seme*. Anche Mendel, nel 1869, si era imbattuto inconsapevolmente nell’apomissia quando, durante i suoi studi sull’ereditarietà dei caratteri, decise di passare dal pisello alla specie *Hieracium pilosella*. Non si hanno informazioni sul numero di incroci che Mendel condusse in quanto la maggior

\* Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

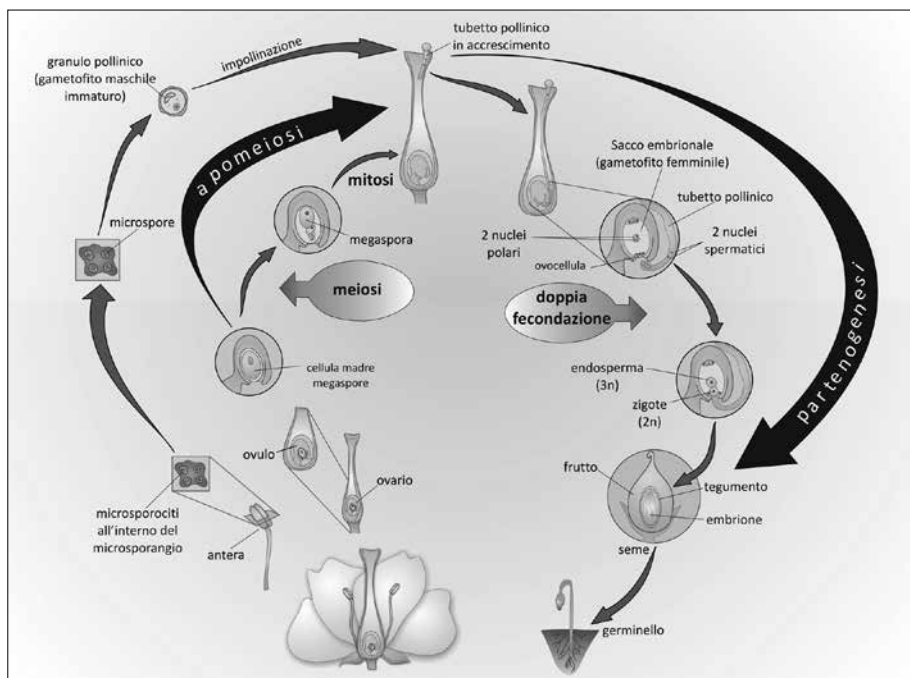


Fig. 1 Ciclo vitale caratteristico delle angiosperme con le principali modificazioni (indicate dalle due frecce nere) che si hanno nella riproduzione apomittica

parte dei suoi dati è andata persa, ma studi condotti sulle informazioni ancora disponibili indicano che egli ne effettuò alcune migliaia in un periodo di oltre 10 anni. In diretto contrasto con quanto osservava in pisello, gli ibridi  $F_1$  di *H. pilosella* mostravano un'ampia segregazione mentre le discendenze delle singole piante  $F_1$  erano uniformi. Agli inizi del '900, quando l'apomissia era ormai un fenomeno conosciuto, uno scienziato (Ostenfeld) riprese lo studio dell'ereditarietà dei caratteri in *Hieracium* effettuando diversi incroci che includevano quelli effettuati da Mendel. Insieme al suo collega Rosenberg, egli confermò la presenza dell'apomissia in questo genere spiegando, a circa 40 anni di distanza, i risultati ottenuti da Mendel. Per molti anni l'apomissia fu considerata dai ricercatori una sorta di curiosità botanica, caratteristica di pochi generi e quasi priva d'interesse. L'attenzione inizialmente rivolta all'aspetto botanico e tassonomico e, in seguito, alle ripercussioni evoluzionistiche ed ecologiche, si è recentemente focalizzata sull'aspetto applicativo a causa delle grandi potenzialità economiche in esso racchiuse. Oggi l'apomissia è presente in più di 300 specie che appartengono a 40 famiglie sia mono che dicotiledoni. Circa il 75% delle specie apomittiche appartiene a 3 grandi famiglie:

Asteraceae, Rosaceae e Poaceae. L'apomissia sembra, invece, essere del tutto assente nella famiglia delle Solanaceae.

#### TIPI DI APOMISSIA

Nelle piante superiori il seme vitale si forma solo se viene rispettata una definita sequenza di eventi che si realizzano all'interno dell'ovulo: la Cellula Madre delle Megaspore, originatasi entro la nucella, produce, a seguito di meiosi, la megaspore funzionale che, mediante tre mitosi successive dà origine al sacco embrionale all'interno del quale si organizzano l'ovocellula e il nucleo polare. La doppia fecondazione di queste due entità, da parte dei 2 nuclei spermatici portati dal tubetto pollinico, determina lo sviluppo dell'embrione e dell'endosperma. Nella riproduzione apomittica, nonostante alcuni dei passaggi sopra elencati vengano omessi (fig. 1), si ha comunque la formazione di seme vitale grazie al susseguirsi di *apomeiosi* (assenza di meiosi che porta alla formazione di un sacco embrionale non ridotto) e *partenogenesi* (sviluppo autonomo dell'ovocellula non ridotta in embrione). Gli embrioni così formati, in assenza di mutazioni, possiedono un patrimonio genetico identico a quello della pianta madre (Bicknell e Koltunow, 2004). Questa forma di apomissia in cui l'embrione si forma da una cellula uovo differenziatasi in un sacco embrionale non ridotto è definita *apomissia gametofitica*. Si parla, invece, di *apomissia sporofitica* (embrionia avventizia) nel caso in cui l'embrione si forma direttamente da una cellula somatica senza produzione del sacco embrionale. Le specie apomittiche gametofitiche possono, a loro volta, distinguersi in base all'origine del sacco embrionale. Si ha *diplosporia* quando il sacco embrionale si origina da una ovocellula non ridotta formatasi a seguito di soppressione (*diplosporia mitotica*) o modificazione (*diplosporia meiotica*) della meiosi e di *aposporia*, quando esso si sviluppa da una cellula della nucella, detta *iniziale aposporica*. La diplosporia di tipo mitotico, con assenza totale di meiosi, assicura l'identità genetica mentre nella diplosporia meiotica (o restituzionale) tale identità non è garantita poiché la soppressione della meiosi avviene dopo la prima divisione, quando si è già avuto il riarrangiamento cromosomico (Albertini et al., 2010).

#### IMPORTANZA DELL'APOMISSIA

Il principale vantaggio dell'apomissia è permettere di ottenere semi geneticamente identici al genitore materno fissando stabilmente le combinazioni ge-

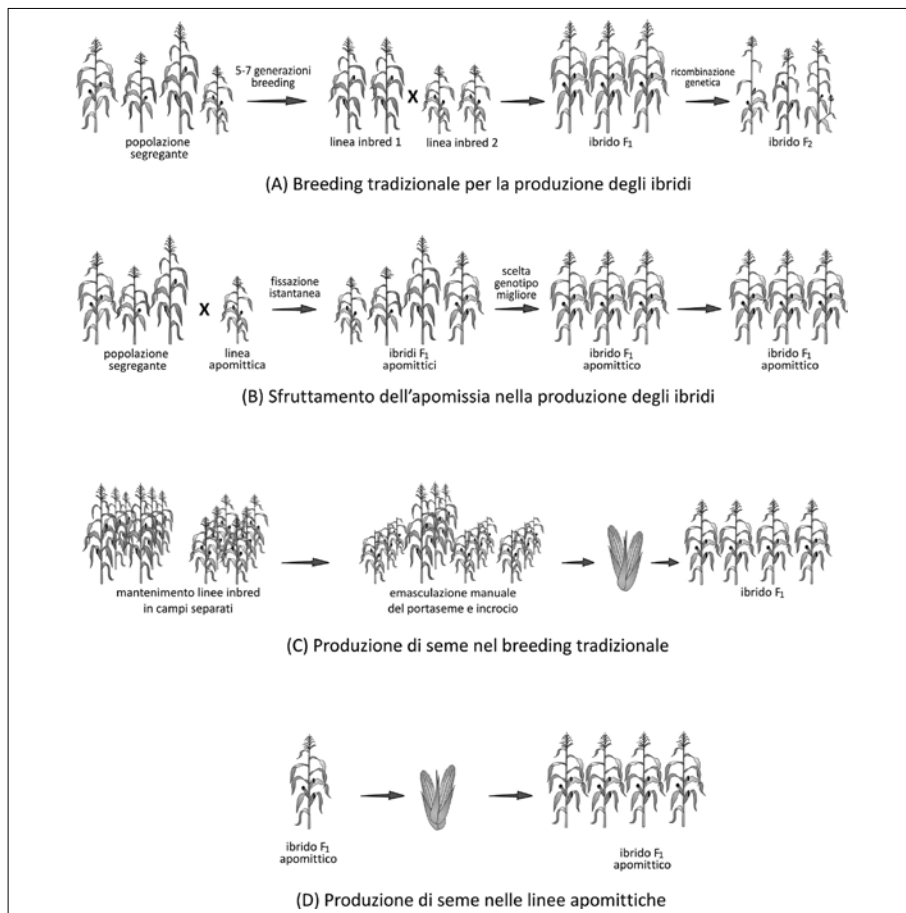


Fig. 2 Schema comparativo tra breeding tradizionale (A e C) e quello supportato dall'impiego dell'apomissia (B e D). Nel breeding tradizionale (A), all'interno di una popolazione segregante (naturale o appositamente sviluppata) vengono selezionati alcuni genotipi che, dopo 5-7 generazioni di autofecondazione e selezione, vengono testati per la loro attitudine a produrre gli ibridi. Le due linee inbred migliori vengono selezionate, moltiplicate in purezza e incrociate per ottenere seme ibrido F<sub>1</sub> da cui nasceranno piante uniformi, molto vigorose e produttive. Tale schema, però, richiede una serie di interventi (C): le due linee inbred devono essere mantenute in purezza e moltiplicate in campi separati. Per l'ottenimento del seme ibrido è necessario costituire un apposito campo dove 1/4 delle piante viene utilizzato come impollinante (linea inbred 1) mentre dalle restanti piante (linea inbred 2) verrà raccolto il seme ibrido. L'agricoltore non utilizza il seme raccolto dagli ibridi F<sub>1</sub> in quanto questo origina popolazioni fortemente variabili (A) a causa della ricombinazione genetica. Utilizzando linee apomittiche, invece, la situazione sarebbe molto più semplice. Una volta selezionati dei genotipi superiori (B), li si incrocia con linee portanti il gene per l'apomissia fissando, così, il genotipo. Da questo momento in poi, l'ibrido F<sub>1</sub> viene mantenuto per numerose generazioni senza necessità di creare campi isolati per il mantenimento delle linee inbred (B e D)



niche superiori e il vigore ibrido in quelle specie dove le varietà si basano sullo sfruttamento dell'eterosi. Oggi, infatti, molte varietà vengono commercializzate sotto forma di ibridi  $F_1$  e, come noto, i semi ibridi non possono essere impiegati per la generazione successiva ( $F_2$ ) dal momento che questa risulterebbe altamente variabile a causa della ricombinazione genetica. In queste specie l'apomissia potrebbe rivoluzionare la produzione del seme determinandone un notevole abbassamento dei costi di produzione. Questo vantaggio, seppur importante in quelle che già vengono commercializzate sotto forma di ibrido (ad esempio mais, pomodoro, peperone, barbabietola da zucchero) sarebbe ancor più rivoluzionario per le specie (come i cereali tipo frumento) nelle quali, oggi, la produzione di seme ibrido non è vantaggiosa (fig. 2). Sfortunatamente, l'apomissia è poco presente tra le specie coltivate ed è completamente assente in quelle utilizzate per l'alimentazione. Uniche eccezioni sembrano essere alcune specie tropicali e subtropicali da frutto come mango, mangostano, *Citrus* e diverse piante foraggere non presenti, o di importanza limitata, nella nostra agricoltura quali *Poa pratensis*, *Pennisetum squamulatum*, *Panicum maximum*, *Brachiaria* spp, *Dichantium* spp. e *Paspalum* spp. È plausibile che la limitata presenza dell'apomissia tra le specie coltivate derivi dalla lunga storia di selezione che avrebbe giocato a sfavore della trasmissione del carattere. La selezione per ottenere genotipi superiori rispetto ai parentali avrebbe sfavorito un meccanismo, come l'apomissia, che in natura tende a mantenere l'uniformità. L'elevata presenza del fenomeno apomittico in specie da frutto tropicali e in specie foraggere coltivate potrebbe esserne una conferma visto lo scarso lavoro di miglioramento genetico cui tali specie sono state sottoposte. Fortunatamente esistono specie apomittiche che, imparentate con specie di notevole interesse agrario, potrebbero essere utilizzate in programmi di miglioramento genetico volti a introdurre il carattere nelle specie di importanza agraria. A oggi, però, nessuno è riuscito a trasferire l'apomissia alle specie di interesse agrario.

È stato stimato che nel riso l'introduzione dell'apomissia porterebbe un beneficio economico di 1,8 miliardi di euro annui mentre il Boston Consulting Group ha quantificato in 2,3 miliardi di euro/anno i benefici legati all'apomissia per cassava e patata. È realistico, quindi, pensare che l'utilizzo dell'apomissia potrebbe rappresentare la rivoluzione agricola di questo millennio. Lo sviluppo della "tecnologia apomittica" renderebbe possibile anche il superamento di barriere legate alla riproduzione sessuale come l'autoincompatibilità e problemi relativi alla propagazione vegetativa (trasmissione di virus). È evidente che, considerato il valore economico dell'apomissia, è auspicabile uno sviluppo della tecnologia apomittica a opera di strutture pubbliche, no profit; ciò garantirebbe

la possibilità di renderla disponibile anche a quelle popolazioni che non potrebbero permettersi di pagare le *royalties* dovute nel caso in cui il carattere venisse brevettato da industrie private. Nonostante l'introduzione dell'apomissia garantirebbe enormi guadagni, la sua manipolazione e impiego in specie come riso sembra oggi più complicata di quanto si sia ritenuto in passato. Geni chiave espressi negli organi riproduttivi di specie a riproduzione sessuale potrebbero essere espressi in modo deregolato nei sistemi apomittici naturali; quali siano tali geni, tuttavia, è ancora quasi del tutto ignoto.

#### DISTRIBUZIONE, FILOGENESI ED EVOLUZIONE

Per molte specie apomittiche è stata teorizzata un'origine ibrida dovuta a una combinazione di poliploidia e ibridizzazione che avrebbe generato allopoliploidi apomittici (Ellerstrom e Zagorcheva, 1977; Carman, 1997; Carman, 2001) a causa della asincronia di eventi regolatori chiave della megasporogenesi, megagametogenesi e fecondazione. Evidentemente l'apomissia si può manifestare in specie diverse a causa del "malfunzionamento" di geni diversi così come diverse sono le tipologie di apomissia sporofitica e gametofitica; tale visione basata su *multiple routes* (Spillane et al., 2004) aumenterebbe le *chances* di una sintesi *de novo* dell'apomissia, ingegnerizzando indipendentemente ciascun elemento, per poi combinarli in un unico genotipo. Oggi, infatti, è largamente accettata la teoria secondo la quale l'apomissia si sarebbe evoluta molteplici volte a partire da ancestrali sessuali. A questo riguardo molto illuminante è un lavoro condotto da Sharbel e collaboratori (2005) in *Boechera holboellii*: analizzando la configurazione allelica di una serie di loci microsatelliti, in individui apomittici e sessuali appartenenti a diverse popolazioni nordamericane, è risultato che la somiglianza tra genotipi con opposto modo di riproduzione, all'interno della stessa popolazione, è superiore a quella tra individui di popolazioni diverse aventi medesimo modo di riproduzione. In ciascuna popolazione, in definitiva, l'apomissia si sarebbe evoluta in modo indipendente e i genotipi apomittici, delle diverse popolazioni, non sarebbero il risultato della dispersione di un ancestrale comune. Questa visione del fenomeno ben si lega alle caratteristiche di plasticità e variabilità delle sue diverse forme. Se la presenza di variabilità, all'interno di sistemi di natura fortemente agamica, sia da attribuire prevalentemente a fenomeni di mutazione o alla ricombinazione dovuta a una residua sessualità, è stato per numerosi anni motivo di discussione tra gli studiosi. Dati recentemente pubblicati su *Hieracium pilosella* indicherebbero nei "residui di sessualità" la causa prima di variabilità genomica nella specie (Houliston e Chapman,

2004). In popolazioni naturali apomittiche australiane di *Hiperycum perforatum*, lo sviluppo del solo 2% di sacchi embrionali sessuali garantisce la realizzazione di numerosi eventi di ricombinazione attraverso le generazioni successive. Proprio perché apomissia e anfimissia non si escludono vicendevolmente, la variabilità genetica esistente in un sistema prevalentemente agamico è di norma maggiore di quella prevedibile; questo aspetto potrebbe giustificare la fissazione e il successo evolutivo di un meccanismo riproduttivo che mina fortemente lo sfruttamento della variabilità da parte delle specie. Di conseguenza, analizzando i sistemi apomittici facoltativi nel loro complesso, rileviamo che gli assetti genomici di embrione ed endosperma risultano molteplici e complessi. Un esempio importante di tale variabilità è stato documentato da Matzk e collaboratori (2001) che, studiando la riproduzione in *H. perforatum*, hanno osservato 11 possibili combinazioni di embrione/endosperma. Ricerche recenti svolte in specie che hanno programmi di sviluppo apomittico differenziati (es. *Hieracium*, *Poa pratensis*, *Tripsacum*) suggeriscono che l'apomissia si basa sulla diversa espressione spaziale e/o temporale di geni che normalmente agiscono durante la riproduzione sessuale (Grimanelli et al., 2003; Tucker et al., 2003; Albertini et al., 2004; Curtis e Grossniklaus, 2007). Tuttavia, per gran parte dei geni candidati finora identificati, il coinvolgimento nel controllo dell'apomissia è in gran parte speculativo (Ozias Akins, 2006) e questo potrebbe essere dovuto alle tecniche utilizzate e al numero di genotipi impiegato. Il dibattito sul controllo genetico dell'apomissia è stato ulteriormente alimentato a seguito delle ipotesi circa il ruolo funzionale della poliploidia e dell'espressione asincrona dei genomi in specie allopoliploidi (Carman, 1997). Di conseguenza, il controllo genetico dell'apomissia è un campo largamente sconosciuto. Recentemente è stato ipotizzato anche un coinvolgimento dei fenomeni di metilazione del DNA nel controllo genetico dell'apomissia a seguito dell'evidenza di un riprogrammazione del pattern di metilazione del DNA nei gameti femminili (Hsieh et al., 2008; Gehring et al., 2009). Sulla base di queste osservazioni è stato proposto il "modello epigenetico" secondo il quale i geni che controllano l'apomissia potrebbero essere i target di cambiamenti epigenetici.

#### GENETICA DELL'APOMISSIA

È stato osservato che apomissia sporofitica e gametofitica sono spesso presenti in specie diverse di una stessa famiglia e questo suggerirebbe un "intreccio evolutivo" e la sovrapposizione dell'espressione di vie riproduttive modificate dovuta sia a caratteristiche dei genomi non ancora note che a fattori ambien-

tali. Un genotipo apomittico, data l'assenza di riproduzione sessuale, può essere visto come un gigantesco gruppo linkage nel quale i geni vantaggiosi non possono sfuggire all'accumulo di mutazioni sfavorevoli (fenomeno noto come *Muller's ratchet*). Seguendo una linea verticale (madre-figlia-nipote) le specie apomittiche vedono limitate le proprie opportunità di evoluzione e la fitness. In molte specie agamosperiche, come ad es. *Taraxacum*, questo è compensato da un elevatissimo livello di variabilità fenotipica (Richards, 1972). Sempre in genotipi apomittici di *Taraxacum* Mogie (1982) ha osservato un'elevata frequenza di ponti anafasici indice di un certo grado di ricombinazione somatica cosa assai poco frequente nei genotipi sessuali.

Le prime teorie sul controllo genetico dell'apomissia, sviluppate dallo studio di *P. pratensis* (Müntzing, 1940), indicavano questo come un carattere controllato da un "delicato equilibrio di geni". Con il passare del tempo, tuttavia, le teorie sono confluite verso l'ipotesi che l'apomissia fosse controllata da uno o pochi geni dominanti o codominanti strettamente associati (Asker e Jerling, 1992; Koultnow et al., 1995). Infatti, nonostante si è quasi certamente di fronte a un carattere complesso, questo viene spesso trasmesso come mendeliano, cioè a controllo monogenico. Nel caso di specie aposporiche come la *P. pratensis* tale/i gene/i permetterebbero a una cellula della nucella di formare il sacco embrionale in assenza di meiosi e di sviluppare l'embrione senza fecondazione. Una volta che lo sviluppo dell'embrione è stato indotto, la sua maturazione potrebbero essere sotto il controllo degli stessi geni che regolano la crescita degli embrioni di origine sessuale. La programmazione ex-novo dell'espressione genica, attraverso la quale cellule somatiche riacquistano la capacità embriogenetica, deve necessariamente essere guidata da geni regolatori, che sempre più attraggono le attenzioni di diversi gruppi di ricerca. Esiste disaccordo tra gli studiosi anche intorno al/i prodotto/i del gene/i regolatore/i del fenomeno: secondo alcuni, infatti, tali proteine sarebbero assenti nelle piante a riproduzione sessuale (teoria del "gain of function" o acquisizione di funzione) ma presenti nelle apomittiche (Savidan et al., 1989); secondo altri, invece, (Mogie, 1988) le proteine coinvolte nella regolazione dei due tipi di riproduzione sarebbero le medesime ma con un'alterata attività spaziale e/o temporale durante lo sviluppo (teoria del "loss of function" o perdita di funzione). Nonostante non manchino i sostenitori della prima, la seconda teoria è quella maggiormente condivisa. Mancano, inoltre, dati definitivi circa le caratteristiche peculiari delle cellule che danno inizio all'apomissia e sul rapporto che esiste tra il *pathway* sessuale e quello apomittico. Secondo alcuni studiosi (Roche et al., 1999) si tratterebbe di vie metaboliche distinte; altri, invece, sostengono che quella apomittica rappresenti un'aberra-

zione della normale riproduzione sessuale dovuta a ibridizzazione, mutazione o effetti epigenetici (Peacock, 1992; Grossniklaus et al., 2001; Albertini et al., 2010).

In particolare, Nogler (1984) sosteneva che le componenti apomittiche si fossero originate per mutazione e dimostrò che, almeno in *Panicum maximum*, l'apomeiosi viene ereditata come un carattere dominante in condizione simplex (*Aaaa*). Alle stesse conclusioni era giunto anche Savidan (1982) in *Ranunculus auricomus*. Queste teorie cozzano, però, con l'evidenza che in molte specie (*apomittiche facoltative*) sacchi embrionali aposporici e meiotici possono coesistere in uno stesso ovulo a indicare una indipendenza dell'apomissia dalla sessualità. In *Cenchrus ciliaris* sono state ipotizzate anche interazioni epistatiche: il gene A controllerebbe l'aposporia mentre il gene B, epistatico di A, sarebbe necessario per ripristinare la sessualità. In *P. pratensis* non solo è stato ipotizzato un controllo genetico distinto per apomissia e sessualità ma è stato addirittura riscontrato un certo grado di ricombinazione tra le due componenti dell'apomissia (aposporia e partenogenesi) dimostrando un loro controllo genetico distinto (Albertini et al., 2001; Matzk et al., 2005).

#### APOMISSIA E POLIPLOIDIA

Altro punto che è stato affrontato nel corso degli anni è la stretta relazione che intercorre tra poliploidia e apomissia. Anche se la ragione di tale associazione è tuttora ignota, sono state elaborate 3 teorie per spiegarla: i) la poliploidia sarebbe richiesta per aumentare l'espressione del carattere piuttosto che per garantirne la presenza poiché, anche se rari, sono stati riscontrati genotipi diploidi apomittici. In *Paspalum notatum*, invece, l'espressione dell'apomissia è risultata direttamente dipendente dal livello di ploidia poiché i geni che potenzialmente la controllano non sono espressi a livello diploide e, un aumento del livello di ploidia, indurrebbe l'espressione del *locus* per l'apomissia; ii) la trasmissione del carattere attraverso le generazioni potrebbe essere mediata da gameti non ridotti che velocemente porterebbero alla formazione di complessi agamici poliploidi. Già nel 1984, Nogler notò come in *Ranunculus auricomus*, l'allele dominante, che conferiva l'apomissia, poteva essere trasmesso solo attraverso gameti diploidi; gameti aploidi venivano prodotti ma originavano sempre individui sessuali. Simili osservazioni sono state fatte per *Tripsacum* e *Pennisetum* (Grimanelli et al., 1998; Jessup et al., 2003); iii) in specie dove l'espressione dell'apomissia richiede la presenza contemporanea di diversi alleli essenziali, posizionati in loci differenti non associati, i gameti

non ridotti agirebbero come un ampio gruppo di associazione (*whole-genome linkage group*) garantendo la trasmissione del carattere.

Carman (1997) ha dimostrato, in una teoria convincente, che esiste relazione tra apomissia e altri eventi inusuali legati alla riproduzione quali polisporia e poliembrionia e che l'ibridazione tra specie affini ha rappresentato un fattore chiave nell'evoluzione di diversi sistemi apomittici. Secondo l'ipotesi di Carman (Carman, 1997), l'apomissia si è originata a causa dell'espressione asincrona di set duplicati di geni coinvolti nella riproduzione sessuale in genomi ibridi poliploidi. Carman vede nell'alloploidia l'origine dell'apomissia. Questa ipotesi è stata ulteriormente perfezionata imputando il processo alla cromatina soprannumeraria (Roche et al., 2001). È possibile che la cromatina in eccesso leghi le DNA-binding protein e impedisca a esse di svolgere il loro ruolo regolativo nei confronti dei geni coinvolti nella megasporogenesi. Il livello ridotto di questi regolatori potrebbe causare l'errata espressione che porta all'apomeiosi. In tal caso, l'apomeiosi potrebbe co-segregare con la cromatina soprannumeraria anche se il gene che causa l'effetto e che è identico nei genotipi apomittici e sessuali è situato altrove nel genoma. Contrariamente all'ipotesi di Carman, le analisi molecolari condotte da Leblanc et al. (1995) dimostrerebbero un'origine autotetraploide/autotetraploide segmentale in *Tripsacum dactyloides*. Autopoliploidia (basata sull'ereditarietà tetrasomica) è stata osservata anche in *Pennisetum squamulatum* (Ozias Akins et al., 1998) e *Paspalum simplex* (Pupilli et al., 1997).

#### APPROCCI SPERIMENTALI PER L'INDIVIDUAZIONE DI GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL FENOMENO APOMITTICO

Come visto, se da un lato molti anni di studi descrittivi sull'apomissia hanno fornito una solida documentazione sui diversi modi in cui il fenomeno si può presentare, dall'altro le conoscenze a riguardo delle sue basi genetiche e molecolari sono piuttosto scarse e, a volte, contraddittorie. Le cause di questo profondo disequilibrio possono essere collegate a 2 aspetti fondamentali: i) la maggior parte delle specie apomittiche non riveste interesse agrario e non presenta specie affini d'importanza agronomica salvo poche eccezioni (es. *Tripsacum* e mais); ii) la natura poliploide della maggior parte delle specie caratterizzate da questa forma di riproduzione ha complicato notevolmente l'avanzamento degli studi e, in particolar modo, la costruzione di mappe genetiche. Le nostre conoscenze molecolari del fenomeno apomittico aumenterebbero notevolmente nel caso in cui i geni espressi in modo specifico/

differenziale negli ovuli dei genotipi apomittici e sessuali fossero identificati. Questo obiettivo può essere raggiunto attraverso due strategie fondamentali: i) analisi del processo apomittico in specie apomittiche naturali e ii) analisi funzionale di mutanti e del profilo di espressione in specie modello che, normalmente, produce seme attraverso riproduzione sessuale. L'obiettivo della prima strategia è individuare e mappare i geni che controllano l'apomissia, con la prospettiva di trasferirli alle specie coltivate, attraverso l'ingegneria genetica (Albertini et al., 2010). Con la seconda strategia, invece, si applica la mutagenesi a specie modello come *Arabidopsis* e riso al fine di identificare quei geni che, quando mutati, risultano in fenotipi che mimano in parte il processo apomittico.

#### 1. Identificazione di geni coinvolti nella regolazione del fenomeno apomittico in specie apomittiche

Negli ultimi anni sono stati intrapresi numerosi studi volti a identificare geni differenzialmente espressi negli stadi iniziali di sviluppo del sacco embrionale di genotipi apomittici e sessuali di *Panicum maximum* (Chen et al., 1999), *Brachiaria* spp. (Leblanc et al., 1997; Dusi, 2001; Rodrigues et al., 2003), *Pennisetum squamulatum* (Vielle-Calzada et al., 1996; Jessup et al., 2003) e *Paspalum* spp. (Pessino et al., 2001). Tutti questi studi erano basati sull'ibridazione sottrattiva e hanno permesso di isolare alcuni geni ai quali, però, non si è riusciti ad attribuire nessuna funzione. Nonostante siano risultati estremamente negativi questi studi hanno permesso di capire che l'apomissia e la riproduzione sessuale potrebbero condividere un pathway comune e che, quindi, le tecniche basate sull'esclusione dei trascritti comuni non possono che risultare fallimentari.

Tra le specie apomittiche, un risultato molto importante è stato ottenuto da Albertini e coll. (2004 e 2005) che hanno dimostrato come il programma di sviluppo dell'embriogenesi zigotica risulterebbe altamente conservato nella partenogenesi apomeiotica. Utilizzando la tecnica dei cDNA-AFLP Albertini e coll. (2004) hanno identificato 179 mRNA differenzialmente espressi tra genotipi apomittici e sessuali di *Poa pratensis*. Per cinque cloni è stata evidenziata alta similarità con un gruppo di geni che in *Arabidopsis*, *M. truncatula* e riso risultano strettamente associati e che in *P. pratensis* potrebbero essere coinvolti nell'apomissia e nell'acquisizione di competenze embriogenetiche da parte di cellule somatiche. Due geni, *SERK* (*Somatic Embriogenesis Receptor-like Kinase*) e *APOSTART* sono caratterizzati e gli autori ne ipotizzano

un coinvolgimento nell'interazione cellula-cellula dal punto di vista sia del trasporto del segnale sia della stimolazione ormonale. Gli autori, inoltre, propongono che l'attivazione del gene *PpSERK* nelle cellule della nucella di genotipi apomittici rappresenterebbe l'interruttore che dà l'avvio allo sviluppo del sacco embrionale e potrebbe reindirizzare i prodotti genici a compartimenti cellulare diversi da quelli tipici. Il profilo di trasporto del segnale mediato da *SERK* può interagire con il profilo ormonale e auxinico controllato da *APO-START*. Gli autori suggeriscono anche un coinvolgimento di *APOSTART* nella meiosi e nella morte cellulare programmata.

## 2. Identificazione di geni coinvolti nella regolazione del fenomeno apomittico in specie sessuali

Già nel 1993 Chandhury e Peacock ipotizzarono che lo studio di geni coinvolti nella riproduzione isolati in *Arabidopsis* avrebbe potuto portare un contributo fondamentale alla comprensione della regolazione dei fenomeni apomittici. Per alcuni anni questo aspetto fu testato con un'intensa attività di ricerca ma la difficoltà di individuazione di altri geni coinvolti e lo scarso ritorno in termini di finanziamenti e pubblicazioni scientifiche portò molti dei gruppi interessati a desistere. Alcuni geni furono comunque identificati, ma a nessuno di essi i ricercatori furono in grado di assegnare un chiaro ruolo nella riproduzione apomittica. Ad esempio, tramite lo studio di mutanti di *Arabidopsis* per il modo di riproduzione, con disfunzioni meiotiche che mimavano il processo apomittico, sono stati isolati diversi geni interessanti. Tra questi si ricordano i) *SPL*, la cui attività, in *Arabidopsis*, è richiesta per la sporogenesi sia maschile che femminile (Yang et al., 1999); ii) *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), considerato uno dei più probabili mediatori del passaggio di una cellula somatica allo stadio embriogenetico (Hect et al., 2001), iii) *LEC1* e *LEC2* che, se sovraespressi, portano allo sviluppo di embrioni direttamente da tessuti vegetativi in assenza di stimoli esogeni di alcun tipo (Lotan et al., 1998); iv). famiglia dei geni *FIS* (Fertilization-Independent Seed, *FIS1/MEA*, *FIS2*, *FIS3/FIE*) che, mutati, permettono lo sviluppo dell'endosperma in assenza dello stimolo della fertilizzazione. Negli ultimi anni c'è stato un fervente rifiorire di questo settore grazie anche all'evoluzione delle tecniche molecolari. Due recenti lavori pubblicati su importanti riviste internazionali sembrano infatti riaprire uno spiraglio sulla possibilità di indurre l'apomissia in specie che oggi si riproducono esclusivamente per via sessuale. Alcuni anni fa un gruppo di studiosi francesi individuò un gene (*osd1*) che controlla l'ingresso nella seconda divisione meiotica in *Arr-*



*bidopsis* e la combinarono con una mutazione che impedisce la ricombinazione tra i cromosomi omologhi al momento dell'appaiamento (*spo11*) e con una mutazione che modifica la segregazione dei cromatidi (*rec8*). Ottennero così un genotipo in cui la meiosi è assente e completamente sostituita dalla mitosi ma che richiedeva comunque la fecondazione per formare semi vitali, cui dettero il nome di **MiMe** (*mitosis instead of meiosis*, d'Erfurth et al., 2009). Naturalmente questi semi derivanti dalla fecondazione di una cellula uovo non ridotta ( $2n$ ) da parte di un polline ridotto (formatosi a seguito di normale meiosi e, quindi, aploide,  $n$ ) mostravano un numero cromosomico anormale (triploide). C'era dunque la necessità di individuare una nuova mutazione che permettesse lo sviluppo dell'embrione in assenza di fecondazione, ma la ricerca in tale senso non aveva prodotto nessun risultato di rilievo. I ricercatori francesi acquisirono una linea dall'Università di Davis (*cenh3*, induttrice di aploidia uniparentale, Ravi e Chan, 2010) e la utilizzarono per creare la loro linea **GEM** (Genome Elimination caused by a Mix of CENH3 variants). Quando MiMe (genitore femminile) venne incrociata con GEM (genitore maschile) produsse una media di 14 semi vitali per siliqua e, di questi, ben il 34% (53 su 155 semi prodotti) era diploide (Marimuthu et al., 2011). Gli individui sviluppati da questi semi avevano un corredo cromosomico esclusivamente di origine materna e completa assenza di cromosomi paterni. Questa è stata la prima prova circa la possibilità di indurre la riproduzione asessuata per seme in piante che normalmente si riproducono per via sessuata, anche se MiMe richiede ancora la fecondazione per sviluppare il seme. Uno sfruttamento massimo del sistema di riproduzione asessuale richiederebbe, invece, che le piante siano capaci di autofecondarsi.

Recentemente, al fine di migliorare questi risultati e ottenere piante apomittiche altamente produttive, tutti i ricercatori europei che studiano il sistema riproduttivo delle piante e quelli che studiano l'apomissia si sono uniti nella COST ACTION "Harnessing plant reproduction for Crop Improvement" finanziata dalla Comunità Europea ([www.hapreci.org](http://www.hapreci.org)). Alla Action si sono uniti anche gruppi di ricerca Australiani, Nord Americani, Argentini e Neozelandesi.

## RIASSUNTO

I semi rappresentano un fattore chiave per la produttività delle piante coltivate. Il successo commerciale di una nuova varietà selezionata dipende dalle caratteristiche delle parti produttive, ma ancora di più dalla loro capacità di produrre semi. In agricoltura, il miglioramento per la qualità e la resa richiedono la messa a punto di nuove metodologie che possano superare i limiti delle procedure del breeding convenzionale. Fra le modificazioni

del sistema riproduttivo notevole importanza riveste l'apomissia, cioè la capacità delle piante di riprodursi in assenza di meiosi e di fecondazione. L'introduzione dell'apomissia in una specie coltivata consentirebbe la fissazione immediata dell'intero genoma delle piante migliori, ridurrebbe i tempi e i costi della selezione e farebbe aumentare enormemente i benefici economici delle colture. Consentirebbe ad esempio di fissare l'eterosi negli ibridi F1 e porterebbe a una produzione costante ed efficiente di fiori, frutti, semi. Sfortunatamente l'apomissia non esiste nella maggior parte delle specie coltivate (alcune eccezioni si trovano nel genere *Citrus*, e nel mango, dove si formano embrioni avventizi). Lo sviluppo della "tecnologia apomittica" (TA) renderebbe possibile il superamento di barriere legate alla riproduzione sessuale (ad es. autoincompatibilità) e i problemi relativi alla propagazione vegetativa (ad es. trasmissione di virus). È stato stimato, ad esempio, che l'impiego dell'apomissia renderebbe possibile la produzione di ibridi di riso fornendo un beneficio economico pari a 1,8 miliardi di euro annui. Lo sviluppo delle TA in agricoltura richiede tuttavia una migliore conoscenza dei processi riproduttivi.

#### ABSTRACT

Seed is the key factor of crop productivity. The commercial success of a newly selected cultivar depends not only on its vegetative attributes but also on its ability to produce seeds. Breeding for seed yield and quality requires new sophisticated technologies, such as apomixis, that will allow overcoming the conventional breeding limits. Apomixis is a naturally occurring mode of asexual reproduction in flowering plants, resulting in embryo formation without meiosis or fertilization of the egg. Seed derived progenies are genetically identical to the maternal parent. In crop species, apomixis would enable the instantaneous fixation of the complete genome of the best plants. The introduction of apomixis in crop species is one of the key desirable traits since it would allow the fixation of heterosis in F1 hybrids leading to efficient and consistent production of high-quality seeds, fruits, and vegetables. Unfortunately, apomixis does not naturally occur in major crop species (some exceptions are *Citrus*, mango and mangosteen, which have adventitious embryony). The development of Apomixis Technology (AT) is expected to have a revolutionary impact on food and agriculture production by reducing cost and breeding time, avoiding some complications of sexual reproduction (incompatibility barriers) and of vegetative propagation (viral transfer). It is estimated that AT in the production of hybrid rice alone could provide benefits exceeding €1800 million per annum. The development of AT in agriculture require a deeper knowledge of reproductive development in plants.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBERTINI E., PORCEDDU A., FERRANTI F., REALE L., BARCACCIA G., FALCINELLI M. (2001): *Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in Poa pratensis L.: cytological and genetic evidences*, «Sexual Plant Reproduction», 14, pp. 213-217.
- ALBERTINI E., MARCONI G., BARCACCIA G., RAGGI L., FALCINELLI M. (2004): *Isolation*

- of candidate genes for apomixis in Poa pratensis L.*, «Plant Molecular Biology», 56, pp. 879-894.
- ALBERTINI E., MARCONI G., REALE L., BARCACCIA G., PORCEDDU A., FERRANTI F., FALCINELLI M. (2005): *SERK and APOSTART: candidate genes for apomixis in Poa pratensis L.*, «Plant Physiology», 138, pp. 2185-2199.
- ALBERTINI E., MARCONI G., RAGGI L., VERONESI F., FALCINELLI M. (2009): *Niente sesso siamo apomittiche*, «Darwin», 29, pp. 36-43.
- ALBERTINI E., BARCACCIA G., MAZZUCATO A., SHARBEL T., FALCINELLI M. (2010): *Apomixis in the biotechnology era*, in *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, a cura di E.C. Pua e M. Davey, Springer, New York, pp. 405-436.
- ASKER S.E., JERLING L. (1992): *Apomixis in Plants*, CRC Press, London.
- BICKNELL R.A., KOLTUNOW A.M. (2004): *Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums*, «Plant Cell», 16, pp. S228-S245.
- CARMAN J.G. (1997): *Asynchronous expression of duplicated genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony*, «Biological Journal of the Linnean Society», 61, pp. 51-94.
- CARMAN J.G. (2001): *The gene effect: genome collisions and apomixis*, in Savidan Y., Carman J.G. & Dresselhaus T. (eds.), *Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, CIMMYT, IRD, European Commission DG VI, Mexico, pp. 95-110.
- CHEN L.Z., MIYAZAKI C., KOJIMA A., SAITO A., ADACHI T. (1999): *Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (Panicum maximum)*, «Journal of Plant Physiology», 154, pp. 55-62.
- CURTIS M.D., GROSSNIKLAUS U. (2007): *Amphimixis and apomixis: two sides of the same coin!*, in *Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives*, a cura di E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. Van Dijk, T.F. Sharbel, Intl Association of Plant Taxonomy Koeltz Scientific Books, Vienna (Austria), pp. 37-62.
- D'ERFURTH I., JOLIVET S., FROGER N., CATRICE O., NOVATCHKOVA M., MERCIER R. (2009): *Turning Meiosis into Mitosis*, «PLoS Biology», 7: e1000124.
- DUSI D.M.A. (2001): *Apomixis in Brachiaria decumbens*, in PhD Thesis, University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands.
- ELLERSTRÖM S., ZAGORCHEVA L. (1977): *Sterility and apomictic embryo-sac formation in Raphanobrassica*, «Hereditas», 87, pp. 107-120.
- GEHRING M., HUH J.H., HSIEH T.F., PENTERMAN J., CHOI Y., HARADA J.J., GOLDBERG R.B., FISCHER R.L. (2006): *DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation*, «Cell», 124, pp. 495-506.
- GRIMANELLI D., LEBLANC O., ESPINOSA E., PEROTTI E., GONZALEZDE-LEAN D. AND SAVIDAN Y. (1998): *Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion*, «Heredity», 80, pp. 40-47.
- GRIMANELLI D., GARCIA M., KASZAS E., PEROTTI E., LEBLANC O. (2003): *Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in Tripsacum*, «Genetics», 165, pp. 1521-1531.
- GROSSNIKLAUS U., NOGLER G.A., VAN DIJK P. (2001): *How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis*, «The Plant Cell», 13, pp. 1491-1497.
- HOULISTON G.J., CHAPMAN H.M. (2004): *Reproductive strategy and population variability in the facultative apomict Hieracium pilosella (Asteraceae)*, «American Journal of Botany», 91, pp. 37-44.

- HSIEH T.F., IBARRA C.A., SILVA P., ZEMACH A., ESHED-WILLIAMS L., FISCHER R.L., ZILBERMAN D. (2009): *Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm*, «Science», 324, pp. 1451-1454.
- JESSUP R.W., BURSON B.L., BUROW G., WANG Y.W., CHANG C., LI Z., PATERSON A.H., HUSSEY M.A. (2003): *Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (Pennisetum ciliare (L.) Link syn. Cenchrus ciliaris L.) as revealed by genome mapping*, «Genome», 46, pp. 304-313.
- KOLTUNOW A.M., BICKNELL R.A., CHAUDHURY A.M. (1995): *Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization*, «Plant Physiology», 108, pp. 1345-1352.
- KOLTUNOW A.M., GROSSNIKLAUS U. (2003): *Apomixis: a developmental perspective*, «Annual Review in Plant Biology», 54, pp. 547-574.
- LEBLANC O., GRIMANELLI D., GONZÁLEZ-DE-LEÓN D., SAVIDAN Y. (1995): *Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 90, pp. 1198-1203.
- LEBLANC O., ARMSTEAD I., PESSINO S., ORTIZ J.P., EVANS C., DOVALLE C. HAYWARD M.D. (1997): *Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of Brachiaria hybrids derived from B-brizantha, an apomictic tropical forage*, «Plant Science», 126, pp. 49-58.
- MARIMUTHU M.P.A., JOLIVET S., RAVI M., PEREIRA L., DAVDA J.N., CROMER L., WANG L., NOGUÉ F., CHAN S.W.L., SIDDIQI I., MERCIER R. (2011): *Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds*, «Science», 331, p. 876.
- MATZK F., MEISTER A., BRUTOVSKÁ R., SCHUBERT I. (2001): *Reconstruction of reproductive diversity in Hypericum perforatum L. opens novel strategies to manage apomixis*, «Plant Journal», 26, pp. 275-282.
- MATZK F., PRODANOVIC S., BÄUMLEIN H., SCHUBERT I. (2005): *The inheritance of apomixis in Poa pratensis confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance*, «Plant Cell», 17, pp. 13-24.
- MOGIE M. (1982): *The status of Taraxacum agamospecies*, Doctor's Thesis, University of Newcastle.
- MOGIE M. (1988): *A model for the evolution and control of generative apomixis*, «Biological Journal of the Linnean Society», 35, pp. 127-153.
- MULLER H.J. (1964): *The Relation of Recombination to Mutational Advance*, «Mutation Research», 106, pp. 2-9.
- MÜNTZING A. (1940): *Further studies on apomixis and sexuality in Poa*, «Hereditas», 26, pp. 115-190.
- NOGLER G.A. (1984): *Gametophytic apomixis*. in: *Embryology of Angiosperms*, a cura di B.M. Johri, Springer-Verlag, New York, pp. 475-518.
- OZIAS-AKINS P., ROCHE D., HANNA W.W. (1998): *Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in Pennisetum squamulatum implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes*, «Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.», 95, pp. 5127-5132.
- OZIAS-AKINS P. (2006): *Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics*, «Critical Review in Plant Science», 25, pp. 199-214.
- PEACOCK J.W. (1992): *Genetic engineering and mutagenesis for apomixis in rice*, in *Proceedings of the International Workshop on Apomixis in Rice*, a cura di K.J. Wilson, The Rockefeller Foundation, New York, pp. 11-21.

- PESSINO S.C., ESPINOZA F., MARTINEZ E.J., ORTIZ J.P.A., VALLE E.M., QUARIN C.L. (2001): *Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual Paspalum notatum*, «Hereditas», 134, pp. 35-42.
- PUPILLI F., CACERES M.E., QUARIN C.L., ARCIONI S. (1997): *Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic Paspalum simplex*, «Genome», 40, pp. 822-828.
- RAVI M., CHAN S.W. (2010): *Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination*, «Nature», 464, pp. 615-619.
- RICHARDS A.J. (1972): *The karyology of some Taraxacum species from alpine regions of Europe*, «Botanical Journal of Linnean Society», 64, pp. 47-59.
- ROCHE D., CONG P., CHEN Z., HANNA W.W., GUSTINE D.L., SHERWOOD R.T., OZIAS-AKINS P. (1999): *An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (Cenchrus ciliaris L.) and Pennisetum squamulatum Fresen*, «Plant Journal», 19, pp. 203-208.
- ROCHE D., HANNA W.W., OZIAS-AKINS P. (2001): *Is supernumerary chromatin involved in gametophytic apomixis of polyploid plants?*, «Sexual Plant Reproduction», 13, pp. 343-349.
- RODRIGUES J.C.M., CABRAL G.B., DUSI D.M.A., DE MELLO L.V., RIGDEN D.J. CARNEIRO V.T.C. (2003): *Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of Brachiaria brizantha*, «Plant Molecular Biology», 53, pp. 745-757.
- SAVIDAN Y.H. (1982): *Nature et hérédité de l'apomixie chez Panicum maximum Jacq*, Tra-vaux et Documents. OSTROM 153, pp. 1-159.
- SAVIDAN Y.H., JANK L., COSTA J.C.G., VALLE C.B. (1989): *Primary Title: Breeding Panicum maximum in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures*, «Euphytica», 41, pp. 107-112.
- SHARBEL T.F., MITCHELL-OLDS T., DOBEŠ C., KANTAMA L., DE JONG J.H. (2005): *Biogeographic distribution of polyploidy and B chromosomes in the apomictic Boechera holboellii complex*, in *Plant Cytogenetics*, a cura di M. Puertas, T. Naranjo, «Cytogenetic and Genome Research», 109, pp. 283-292.
- SPILLANE C., CURTIS M.D., GROSSNIKLAUS U. (2004): *Apomixis technology development: virgin births in farmers' fields?*, «Nature Biotechnology», 22, pp. 687-691.
- TUCKER M.R., ARAUJO A.C.G., PAECH N.A., HECHT V., SCHMIDT E.D.L., ROSSELL J.B., DE VRIES S.C., KOLTUNOW A.M.G. (2003): *Sexual and apomictic reproduction in Hieracium subgenus Pilosella are closely interrelated developmental pathways*, «Plant Cell» 15, pp. 1524-1537.
- VIELLE CALZADA J.P., NUCCIO M.L., BUDIMAN M.A., THOMAS T.L., BURSON B.L., HUSSEY M.A. WING R.A. (1996): *Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of Pennisetum ciliare (L) Link*, «Plant Molecular Biology», 32, pp. 1085-1092.



## Gameti non ridotti: citologia e uso nel miglioramento genetico vegetale

### INTRODUZIONE

Nel mondo vegetale si riscontra spesso una situazione genomica molto particolare, la poliploida. Con essa si indica la presenza di un numero multiplo di copie, superiore a due, del corredo cromosomico somatico di un individuo. Secondo alcune stime è poliploide il 70% delle Angiosperme e il 95% delle Pteridofite. Anche alcune specie tradizionalmente considerate diploidi, come *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Vision et al., 2000) e riso (*Oryza sativa* e *Oryza japonica*, Goff et al., 2002) si sono rivelate, in seguito al sequenziamento dell'intero genoma, paleopoliploidi che hanno subito una diploidizzazione nel corso dell'evoluzione. C'è da rimarcare, infine, che il 50% circa delle specie vegetali di interesse agrario è poliploide. In tabella 1 sono riportate alcune delle specie di interesse agronomico ed economico con corredo cromosomico poliploide.

Nelle piante possono distinguersi due diversi tipi di poliploidi: gli auto- e gli allopoliploidi. I primi sono poliploidi originatisi attraverso il raddoppiamento di uno stesso genoma o dalla combinazione di genomi geneticamente molto simili. Di conseguenza, tra i cromosomi esiste un'omologia quasi perfetta. Gli autopoliploidi possono quindi formare multivalenti in meiosi e sono caratterizzati da eredità polisomica (con possibile segregazione cromatidica). Gli allopoliploidi, invece, hanno origine dalla combinazione di genomi distinti a seguito di ibridazione interspecifica e successivo raddoppiamento del numero cromosomico, che consente di superare la sterilità degli ibridi. Per

\* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università di Napoli

|                  |   |
|------------------|---|
| Cereali          | <i>Triticum aestivum</i> (6x= 42); <i>T. durum</i> (4x= 28); <i>Avena sativa</i> (6x=42); <i>A. nuda</i> (6x=42)  |
| Foraggiere       | <i>Dactylis glomerata</i> (4x=28); <i>Festuca arundinacea</i> (4x=28); <i>Agropyrum repens</i> (4x=28); <i>Paspalum dilatatum</i> (4x=40)                                     |
| Leguminose       | <i>Medicago sativa</i> (4x=32); <i>Lupinus alba</i> (4x=40); <i>Trifolium repens</i> (4x=32); <i>Arachis hypogaea</i> (4x=40); <i>Lotus corniculatus</i> (4x=32)              |
| Industriali      | <i>Nicotiana tabacum</i> (4x=48) <i>Coffea spp.</i> (4x=44 fino a 8x); <i>Brassica napus</i> (4x=38); <i>Saccharum officinalis</i> (8x=80); <i>Gossypium hirsutum</i> (4x=52) |
| Piante da tubero | <i>Solanum tuberosum</i> (4x=48); <i>Ipomoea batatas</i> (6x=96); <i>Dioscorea sativa</i> (6x=60)   |
| Arboree          | <i>Prunus domestica</i> (6x=48); <i>Musa</i> (3x=33; 4x=44); <i>Citrus aurantiifolia</i> (3x=27); <i>Actinidia deliciosa</i> (4x=116); <i>Prunus cerasus</i> (4x=32)          |

Tab. 1 *Esempi di specie poliploidi di interesse agrario. Per ciascuna specie, in parentesi, è indicato il corredo cromosomico somatico*

ogni cromosoma, infatti, c'è un omologo e in meiosi si formano bivalenti con molta regolarità. La formazione dei bivalenti è dovuta al fatto che l'appaiamento avviene esclusivamente tra cromosomi omologhi: in questo caso si ha una normale eredità disomica. L'alloploidia è probabilmente la forma di poliploidia più diffusa in natura; si riscontra tipicamente nei frumenti coltivati e in varie specie del genere *Brassica* e *Gossypium*. I frumenti coltivati, appartenenti al genere *Triticum*, si sono evoluti da forme poliploidi originatesi in natura per mezzo di ibridazioni interspecifiche seguite da raddoppiamenti cromosomici. Le specie tetraploidi (*Triticum durum*,  $2n=4x=28$ ) hanno avuto origine dalla combinazione di due specie diploidi, mentre quelle esaploidi (*Triticum aestivum*,  $2n=6x=42$ ) hanno coinvolto l'incorporamento di un altro genoma diploide in quello delle forme tetraploidi.

I poliploidi possono evidenziare caratteristiche morfologiche, biochimiche, ecologiche e citologiche che non sono rinvenibili nei loro progenitori diploidi. Alcuni di questi caratteri, come ad esempio l'aumentata tolleranza alla siccità e la resistenza ai patogeni, la tendenza alla propagazione vegetativa, l'aumento della capacità fotosintetica e la maggiore dimensione degli organi vegetativi e riproduttivi, possono consentire ai poliploidi di colonizzare nuove nicchie ecologiche (Leitch e Leitch, 2008). I cambiamenti fenotipici indotti dalla poliploidizzazione, se presenti e di interesse, possono essere utili anche per il lavoro di miglioramento genetico. Il raddoppiamento cromosomico, inoltre, è utile anche perché consente di superare l'autoincompatibilità e di produrre varietà triploidi sterili (apirene). I meccanismi mediante i quali la poliploidia contribuisce alla manifestazione di nuova variabilità non sono stati ancora chiariti, ma si ritiene che i geni duplicati abbiano attenuato l'azione degli elementi di controllo e possano



perciò divergere tra loro in termini funzionali, creando così nuovi fenotipi. Questo meccanismo, tipico dei genomi poliploidi, è noto come “neofunzionalizzazione”.

I poliploidi possono essere indotti attraverso due meccanismi. Il primo è ascrivibile alla poliploidizzazione somatica causata da anomalie mitotiche che inibiscono la formazione del fuso: i due cromatidi di ciascun cromosoma sono incapaci di movimento e si forma un nucleo di restituzione avente un numero cromosomico doppio rispetto a quello atteso. Il processo può essere indotto artificialmente impiegando alcaloidi come la colchicina o erbicidi come l'orizalina (Dhooghe et al., 2011). Il secondo meccanismo è quello della poliploidizzazione sessuale, che è basato sulla formazione di gameti con corredo cromosomico non ridotto (definiti anche gameti  $2n$  o gameti non ridotti). In questo caso mutazioni meiotiche alterano il normale percorso della sporogenesi e i gameti prodotti hanno un corredo cromosomico somatico. Proprio i gameti  $2n$ , riportati in quasi tutte le Angiosperme (Harlan e De Wet, 1975), appaiono i principali responsabili dei processi che portano alla formazione di poliploidi (Otto e Whitton, 2000; Carputo et al., 2003). I gameti  $2n$  si rivelano molto importanti anche nel miglioramento genetico, in quanto combinano la possibilità di aumentare il corredo cromosomico con la ricombinazione meiotica. Essi, inoltre, consentono di trasferire diversità allelica e geni utili da specie selvatiche a varietà coltivate, di massimizzare l'eterosi e di superare barriere di incompatibilità interspecifica. In questo lavoro sono descritti i principali meccanismi meiotici (mutazioni) che portano alla formazione dei gameti  $2n$  ed è discussa la loro utilizzazione nel miglioramento genetico, anche alla luce delle nuove acquisizioni nel campo della genomica funzionale e strutturale.

#### LA FORMAZIONE DEI GAMETI $2N$ :

##### MUTAZIONI MEIOTICHE E MECCANISMI GENETICI

Le anomalie meiotiche più frequenti alla base della formazione di gameti  $2n$  sono quelle che alterano l'appaiamento dei cromosomi omologhi, la corretta formazione dei fusi e la citocinesi o che causano l'omissione di una delle due divisioni meiotiche. È stato anche ipotizzato un meccanismo di restituzione post-meiotica avente come risultato la formazione di gameti  $2n$  completamente omozigoti. Una delle mutazioni più diffuse è quella che determina un orientamento anomalo dei fusi in metafase II della meiosi (fusi paralleli, uniti e tripolari, tutte varianti della stessa mutazione genica). In presenza di questa muta-

zione, invece di una normale tetraide di quattro spore  $n$ , alla fine della meiosi si forma una diade con due microspore  $2n$ . Nel caso di fusi tripolari si forma una triade costituita da due spore  $n$  e una spora  $2n$ . La formazione di fusi paralleli è la mutazione più comune per la produzione di polline  $2n$  in numerose specie, tra cui erba medica, patata, rosa, trifoglio, patata dolce, cassava. A livello di megasporogenesi, invece, tra le mutazioni più diffuse c'è l'omissione della seconda divisione meiotica; essa porta alla formazione di due megaspore  $2n$ : una di queste degenera, mentre l'altra produce la spora funzionale. Altre varianti meiotiche che causano la produzione di ovocellule  $2n$  sono la fusione dei prodotti nucleari originati dalla seconda divisione, anafasi II irregolari, divisioni meiotiche ritardate e irregolarità nella formazione degli assi dei fusi in metafase I.

Le mutazioni meiotiche che portano alla formazione di gameti  $2n$  sono generalmente equivalenti, dal punto di vista genetico, ai meccanismi di restituzione del nucleo in prima (first division restitution, FDR) o seconda (second division restitution, SDR) divisione meiotica (Peloquin et al., 2003). La mutazione fusi paralleli, per esempio, è equivalente a un meccanismo FDR, mentre l'omissione della seconda divisione meiotica è equivalente a SDR. Le conseguenze genetiche associate ai diversi meccanismi sono molto importanti. Con meccanismi di tipo FDR, tutti i loci dal centromero al primo crossing over che sono eterozigoti nel parentale sono eterozigoti anche nel gamete  $2n$ , e il 50% dei loci tra il primo e il secondo crossing over che è eterozigote nel parentale sono eterozigoti anche nel gamete  $2n$ . Se non avviene il crossing over, allora il genotipo intatto del parentale diploide sarà incorporato in ciascun gamete  $2n$ . Con meccanismi SDR, invece, la percentuale di eterozigosi trasmessa tramite i gameti  $2n$  è notevolmente inferiore. Tutti i loci eterozigoti dal centromero al primo crossing over saranno omozigoti nei gameti  $2n$ ; inoltre, tutti i loci tra il primo e il secondo crossing over eterozigoti nel parentale saranno eterozigoti nei gameti. Con meccanismi FDR i gameti  $2n$  che si formano sono simili geneticamente e assomigliano al clone parentale dal quale derivano. Al contrario, i meccanismi SDR producono una popolazione eterogenea di gameti altamente omozigoti. Proprio la trasmissione dell'eterozigosi rappresenta uno dei maggiori vantaggi della poliploidia nel miglioramento genetico, in quanto a una maggiore eterozigosi corrisponde una maggiore eterosi per i caratteri quantitativi.

Numerose ricerche hanno dimostrato che i gameti  $2n$  generalmente sono sotto un controllo genetico monogenico e recessivo: nelle specie diploidi di patata, ad esempio, i genotipi *psps* manifestano fusi paralleli in metafase II e quelli *osos* presentano omissione della seconda divisione meiotica. In alcuni casi è stata ipotizzata la necessità di geni minori per l'espressione del fenotipo mutato o un controllo quantitativo del carattere (Ramanna e Jacobsen,

2003). Una caratteristica comune a tutte le mutazioni meiotiche descritte è che esse presentano una penetranza incompleta e una espressività variabile. È stato anche osservato che le condizioni ambientali possono avere un effetto considerevole sulla frequenza di produzione di gameti  $2n$ , sebbene non sia stato ancora possibile determinare uno specifico fattore ambientale che ne influenzi sempre la frequenza. I risultati ottenuti a Portici alcuni anni fa in ibridi *S. phureja*-*S. tuberosum* di patata hanno evidenziato che solo i cloni con una bassa produzione di polline  $2n$  (<5%) mantengono costantemente basso il livello di produzione di polline  $2n$  durante l'intero periodo di fioritura (Filotico et al., 1995). Recentemente in ibridi *Brassica napus* x *B. carinata* è stato dimostrato un chiaro effetto delle basse temperature (10°C di giorno e 5°C di notte) sulla percentuale di meiociti con orientamento parallelo dei fusi in metafase II e, quindi, sulla produzione di polline  $2n$  (Mason et al., 2011).

I progressi nei settori delle biotecnologie e della genomica hanno consentito di delucidare i meccanismi di formazione dei gameti  $2n$  e di fornire utili strumenti ai miglioratori. Alcuni autori hanno cercato di mappare i loci responsabili della produzione di gameti  $2n$  e di sviluppare marcatori molecolari per la selezione assistita. In erba medica ad esempio, confrontando il DNA di genotipi produttori e non produttori di ovocellule  $2n$ , Barcaccia et al. (2000) hanno identificato un marcatore molecolare di tipo ISSR associato al gene *Tne* il quale, in condizione omozigote recessiva, determina la produzione di ovocellule  $2n$  e numerosi marcatori di tipo RAPD e AFLP che cosegregano con il carattere. Più recentemente in *Arabidopsis thaliana* è stato isolato e descritto per la prima volta il gene che, a seguito di mutazione recessiva, porta alla formazione di polline  $2n$  (d'Erfurth et al., 2008). Il gene, denominato *Arabidopsis thaliana Parallel Spindle1* (*AtPS1*), presenta sette esoni e sei introni e codifica per una proteina di 1477 aminoacidi. In tre forme alleliche mutate, denominate *Atps1-1*, *Atps1-2*, *Atps1-3* controlla la disposizione parallela, tripolare e unita dei fusi nella meiosi II maschile, senza alcun effetto sulla meiosi femminile. Un effetto simile è stato recentemente descritto in un altro mutante, *jason*, anch'esso legato alla produzione di polline  $2n$  (De Storme e Geelen, 2011).

#### UTILIZZAZIONE DEI GAMETI $2n$ NEL MIGLIORAMENTO GENETICO

I gameti  $2n$  sono ampiamente utilizzati nel miglioramento genetico per effettuare incroci tra specie con ploidie differenti e per produrre ploidie ponte nel caso di barriere sessuali (es. post-zigotiche) che impediscono l'incrocio tra due specie appartenenti ai gene pool primario e terziario, rispettivamente. Tra

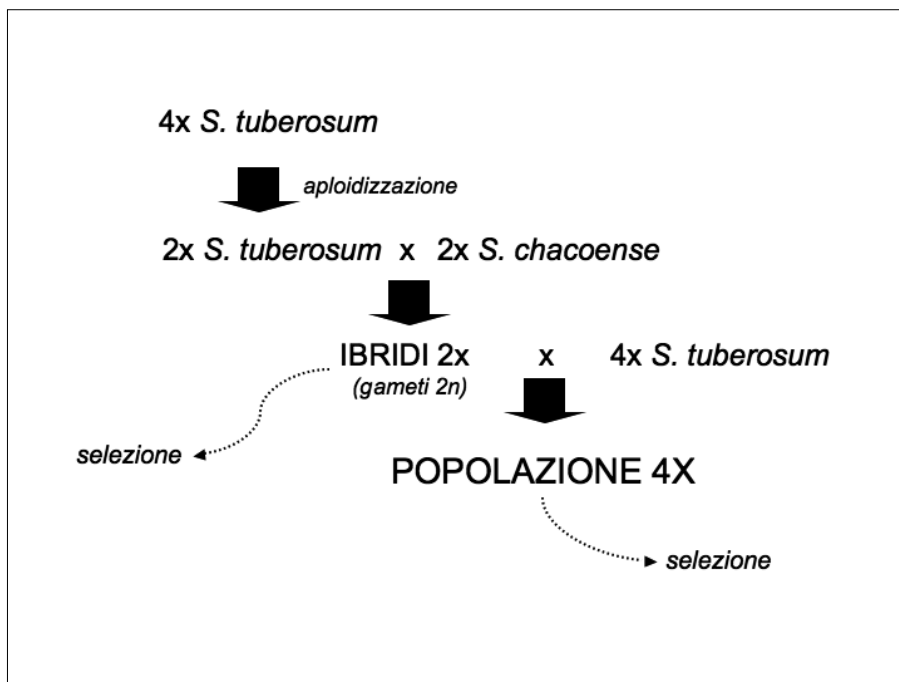


Fig. 1 Schema di miglioramento genetico della patata coltivata ( $2n=4x=48$ ) basato sulla produzione di aploidi e sulla poliploidizzazione sessuale unilaterale

le colture nelle quali si è fatto il più ampio uso di gameti  $2n$  vi sono la patata, l'erba medica, la rosa, il trifoglio, la cassava, il garofano, i cereali e il giglio. La patata è tra le specie in cui questa utilizzazione ha avuto i maggiori successi. Ciò è legato ad alcune sue caratteristiche che forniscono le basi per un utilizzo efficace dei gameti  $2n$  nel miglioramento genetico. La patata coltivata *S. tuberosum*, infatti, è un tetraploide ( $2n=4x=48$ ) da cui è semplice ottenere genotipi aploidi (sporofiti con il corredo cromosomico del gametofito, quindi con 24 cromosomi) attraverso incroci  $4x \times 2x$  con *S. phureja*. Gli aploidi sono incrociati con le specie selvatiche diploidi che recano geni di interesse per il miglioramento genetico e gli ibridi ottenuti, con corredo cromosomico diploide, sono sottoposti a selezione non solo per i caratteri di interesse (es. resistenza a stress), ma anche per la produzione di gameti  $2n$ . In questo tipo di approccio, infatti, i gameti  $2n$  consentono l'uso di tali ibridi in incroci  $4x - 2x$  con le varietà tetraploidi per ritornare al livello tetraploide della patata coltivata per un successivo ciclo di selezione (fig. 1). Questo schema di miglioramento genetico è basato sulla cosiddetta poliploidizzazione sessuale

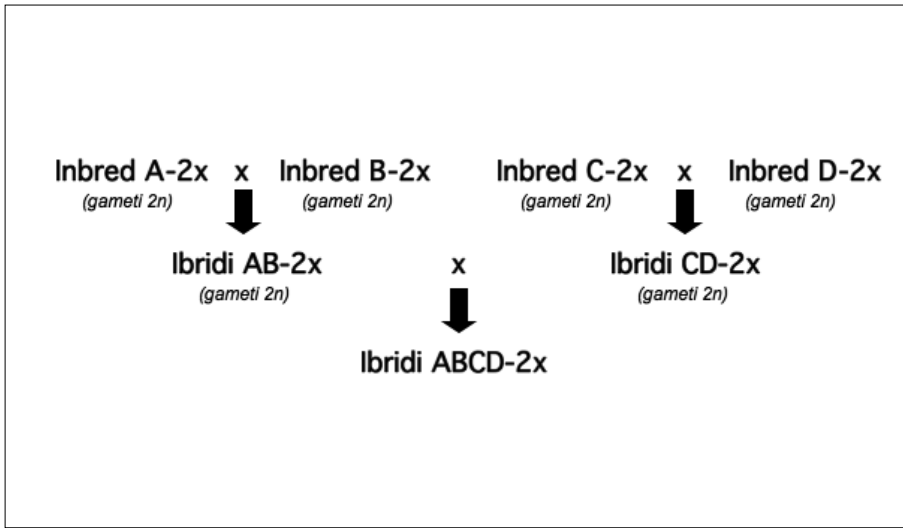


Fig. 2 Schema di miglioramento genetico dell'erba medica ( $2n=4x=32$ ) basato sulla produzione di ibridi semplici produttori di gameti  $2n$  e di ibridi doppi tramite poliploidizzazione sessuale bilaterale (da Barcaccia et al., 2003)

unilaterale in cui solo uno dei due genitori produce gameti  $2n$  (quello con la ploidia più bassa). Un grosso vantaggio di questo schema è che la prima selezione si effettua a livello diploide, molto più semplice di quello tetraploide della patata coltivata. Numerosi sono anche gli esempi riportati in letteratura sull'uso della poliploidizzazione sessuale per trasferire caratteri di interesse. In patata, per esempio, la resistenza a *Erwinia carotovora* di *S. tarijense* è stata trasferita a *S. tuberosum* attraverso incroci  $2x \times 4x$ . Un secondo tipo di poliploidizzazione sessuale, denominato bilaterale perché prevede il coinvolgimento di gameti maschili e femminili  $2n$ , è stato proposto in erba medica per la produzione di ibridi doppi (Barcaccia et al., 2003). Esso coinvolge l'uso di quattro linee inbred distanti geneticamente, due produttrici di ovocellule  $2n$  e due di polline  $2n$ . Gli ibridi semplici ottenuti, selezionati per caratteri di interesse e per la produzione di gameti  $2n$ , sono utilizzati in schemi di poliploidizzazione sessuale bilaterale che portano alla produzione di ibridi doppi altamente eterozigoti (fig. 2). La scelta del tipo di poliploidizzazione da utilizzare dipende dai gameti  $2n$  disponibili (polline  $2n$  o ovocellule  $2n$ ) e, nel caso di poliploidizzazione sessuale unilaterale, dalla fertilità del parentale con ploidia più alta. Dato l'alto livello di interazioni intra- e interlocus trasmesse dai gameti  $2n$ -FDR, l'ampia diffusione di polline  $2n$  e la relativa facilità di identificare mutanti che producono polline  $2n$ , generalmente gli schemi di

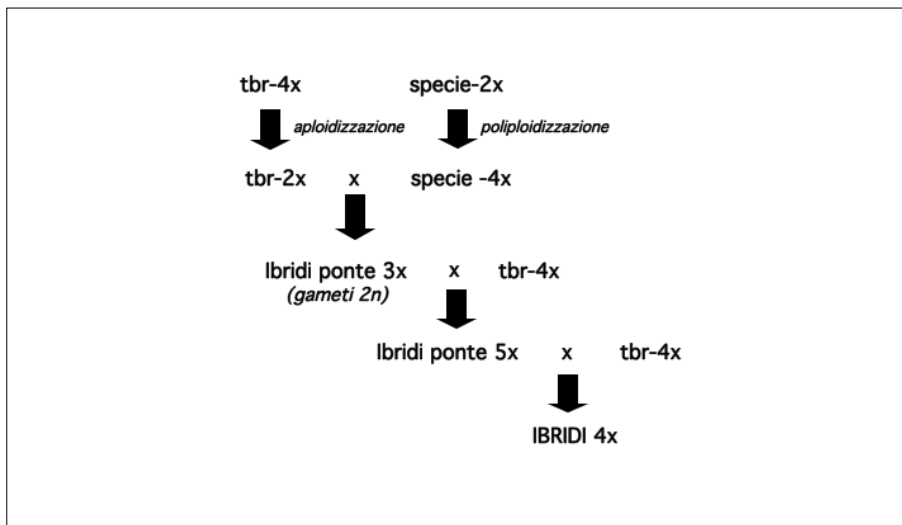


Fig. 3 Schema di miglioramento genetico della patata coltivata ( $2n=4x=48$ ) basato sulla manipolazione dei livelli di ploidia e sulla produzione di ploidie ponte triploidi e pentaploidi

poliploidizzazione sessuale più utilizzati si basano su incroci  $4x \times 2x$ -FDR. La poliploidizzazione sessuale bilaterale può essere utilizzata quando sono disponibili ibridi diploidi superiori produttori di ovocellule  $2n$  e di polline  $2n$ . Questo metodo consente, come in precedenza descritto in erba medica, la combinazione in genotipi tetraploidi di diversi caratteri provenienti da due ibridi interspecifici diploidi. Inoltre permette la trasmissione di elevati livelli di eterozigosi nella progenie  $4x$ , specialmente quando gli ibridi  $2x$  utilizzati hanno un background genetico molto differente.

La poliploidizzazione sessuale rappresenta probabilmente il modo più semplice per l'utilizzazione dei gameti  $2n$  nel "breeding". Tuttavia, la presenza di meccanismi di isolamento può impedire l'introggressione di geni utili da alcune specie selvatiche, limitandone le possibilità di utilizzo nei programmi di miglioramento genetico. Per superare tali barriere sono possibili approcci basati sulla produzione di ploidie ponte  $F_1$  triploidi (fig. 3). Ancora una volta la patata può fornire un buon modello di riferimento. In patata ogni specie ha un suo valore in *endosperm balance number* (EBN), un numero intero variabile tra 1 a 4 che si riduce con la meiosi, proprio come il corredo cromosomico (Johnston et al., 1980). Gli incroci tra specie differenti sono possibili solo se i gameti da esse prodotti hanno uno stesso valore di EBN o se la specie con EBN minore produce gameti  $2n$ . Le ploidie ponte triploidi sono prodotte direttamente attraverso incroci  $2x(1EBN) - 2x(2EBN)$ , se il

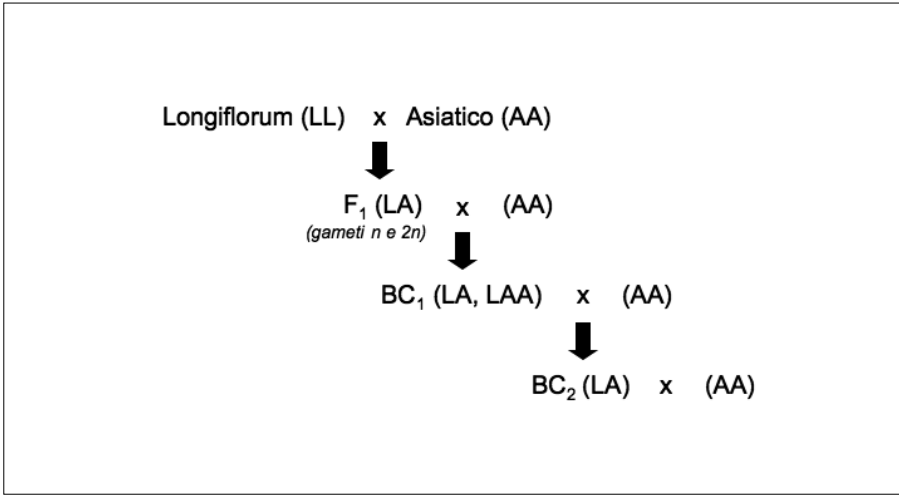


Fig. 4 Schema ipotetico di miglioramento genetico del giglio basato sulla produzione di ibridi semplici produttori di gameti  $2n$  e di ibridi doppi tramite poliploidizzazione sessuale bilaterale (da Kahn et al., 2009)

parentale 1EBN produce gameti  $2n$ ; questi ultimi, infatti, garantiscono lo stesso valore in EBN tra i gameti maschili e femminili. In questi schemi di miglioramento genetico alla produzione di ibridi ponte triploidi segue la sintesi di ibridi pentaploidi (Carputo et al., 1997). Essi sono infatti ottenuti da incroci  $3x(2EBN) - 4x(4EBN)$  tra gli ibridi  $F_1$  triploidi e varietà tetraploidi di *S. tuberosum*. Per la loro produzione è necessario che i triploidi formino gameti  $2n$ , gli unici gameti che garantiscono lo stesso EBN tra i parentali. Prodotti gli ibridi pentaploidi, risulta poi relativamente facile procedere con i reintroci, in quanto i pentaploidi hanno un  $EBN = 4$ , e quindi sono facilmente incrociabili con *S. tuberosum*, anch'esso 4EBN. Il successo di questo tipo di approccio è ampiamente documentato in letteratura.

L'uso dei gameti  $2n$  è stato anche proposto in allopoliploidi (Khan et al., 2009). In *Lilium* esistono tre forme coltivate: Longiflorum, Asiatico e Orientale, con genomi molto differenti e, almeno in origine, diploidi. Gli ibridi interspecifici sono in genere sterili a causa di disturbi meiotici. Tuttavia, la possibilità di avere ibridi che producono sia polline  $n$  che polline  $2n$  apre molte prospettive al miglioramento genetico. Infatti, a livello diploide si può fare la selezione di genotipi superiori che sono poi impiegati, grazie ai gameti  $2n$ , per produrre poliploidi sessuali. Come riportato in figura 4, gli ibridi diploidi Longiflorum-Asiatico producono entrambe le tipologie gametiche e, usati in reintroci con il parentale Asiatico, possono produrre  $BC_1$  ricom-

binanti sia diploidi sia allotriploidi. Le  $BC_1$  triploidi, a loro volta usate in reincroci  $3x - 2x$ , possono generare  $BC_2$  diploidi ricombinanti. Le progenie diploidi prodotte dai reincroci, selezionate per l'assenza di caratteri indesiderati, sono utilizzabili in schemi di poliploidizzazione sessuale per sfruttare i vantaggi associati ai gameti  $2n$ .

## CONCLUSIONI

La diffusione delle specie poliploidi da una parte e la presenza di gameti  $2n$  in numerosi taxa dall'altra porta alla logica conclusione che i gameti  $2n$  sono strumenti molto importanti per il miglioramento genetico. Ma ci sono numerose altre considerazioni a supporto di tale ipotesi. Infatti, i genotipi produttori di questi gameti non ridotti possono essere identificati in modi relativamente semplici e veloci; una facile analisi al microscopio ottico dei granuli pollinici, infatti, consente di identificare i genotipi produttori di polline  $2n$  e di stimarne la frequenza di formazione. È noto che costi ridotti ed efficienza sono alla base di qualsiasi scelta del miglioramento genetico. I gameti  $2n$ , inoltre, hanno spesso una base genetica semplice e quindi la capacità di produrre tali gameti è ereditata abbastanza facilmente dalle progenie. C'è poi da sottolineare che le conoscenze generate in *Arabidopsis* sui meccanismi molecolari correlati con la formazione di gameti  $2n$  e sui geni coinvolti aprono nuove e stimolanti prospettive per il miglioramento genetico vegetale. Strategie di silenziamento genico basate, ad esempio, su RNAi (interferenza dell'RNA) o indotto da virus (VIGS) potrebbero portare all'induzione di gameti  $2n$  anche in genotipi che non li producono. Il sequenziamento dei genomi vegetali, infine, può consentire l'identificazione di omologhi di *AtPS1* anche in specie di interesse agrario (Aiese-Cigliano et al., 2011).

## RIASSUNTO

I gameti con corredo cromosomico non ridotto (gameti  $2n$ ) sono molto diffusi tra le angiosperme e sono ritenuti i principali responsabili della formazione di poliploidi nel regno vegetale. Essi sono il risultato di mutazioni (in genere monogeniche e recessive) che alterano il normale percorso della meiosi e rappresentano importanti strumenti per il miglioramento genetico vegetale, consentendo il trasferimento di geni e di diversità allelica tra specie differenti. In questo lavoro, dopo avere descritto alcune delle principali mutazioni che portano alla formazione di gameti  $2n$  e le conseguenze genetiche a esse associate, sono presentate alcune strategie di poliploidizzazione sessuale utilizzate per il



miglioramento genetico di importanti specie di interesse agrario. Le nuove prospettive di impiego dei gameti  $2n$ , infine, sono discusse alla luce dei progressi nei settori delle biotecnologie e della genomica vegetale.

#### ABSTRACT

Gametes with a somatic chromosome number ( $2n$  gametes) are widespread within angiosperms and are considered the main responsible for polyploid plant formation. They are often the result of recessive mutations affecting the meiotic route. They also represent essential ingredients for plant breeding, allowing the transfer of noteworthy genes as well as allelic diversity between different species. In this paper we first describe the main cytological anomalies leading to  $2n$  gamete formation and point out their genetic consequences. We also outline possible breeding strategies based on sexual polyploidization crossing schemes involving  $2n$  gametes. Finally, in light of the scientific progresses in the field of molecular biology and biotechnology, we discuss the new exciting perspectives on the use of  $2n$  gametes.

#### BIBLIOGRAFIA

- AIESE-CIGLIANO R., SANSEVERINO W., CREMONA G., CONSIGLIO F.M., CONICELLA C. (2011): *Evolution of Parallel Spindles Like genes in plants and highlight of unique domain architecture*, «BMC Evolutionary Biology», 11, pp. 78-91.
- BARCACCIA G., ALBERTINI E., ROSELLINI D., TAVOLETTI S., VERONESI F. (2000): *Inheritance and mapping of  $2n$ -egg production in diploid alfalfa*, «Genome», 2000, 43, pp. 528-537.
- BARCACCIA G., TAVOLETTI S., MARIANI A., VERONESI F. (2003): *Occurrence, inheritance and use of reproductive mutants in alfalfa improvement*, «Euphytica», 1, pp. 37-56.
- CARPUTO D., BARONE A., CARDI T., SEBASTIANO A., FRUSCIANTE L., PELOQUIN S.J. (1997): *Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (Solanum commersonii Dun.)*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of USA», 94, pp. 12013-12017.
- CARPUTO D., BASILE B., CARDI T., FRUSCIANTE L. (2000): *Erwinia resistance in backcross progenies of Solanum tuberosum x S. tarijense and S. tuberosum (+) S. commersonii hybrids*, «Potato Research», 43, pp. 135-142.
- CARPUTO D., FRUSCIANTE L., PELOQUIN S.J. (2003): *The role of  $2n$  gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing Solanums*, «Genetics», 163, pp. 287-294.
- D'ERFURTH I., JOLIVET S., FROGER N., CATRICE O., NOVATCHKOVA M., SIMON M., JENCZEWSKI E., MERCIER R. (2008): *Mutations in AtPS1 (Arabidopsis thaliana Parallel Spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains*, «Plos Genetics», 4, pp. 1-9.
- DE STORME N., GEELEN D. (2011): *The Arabidopsis mutant jason produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II*, «Plant Physiology», 155, pp. 1403-1415.

- DHOOGHE E., VAN LAERE K., EECKHAUT T., LEUS L., VAN HUYLENBROECK J. (2011): *Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro*, «Plant Cell, Tissue and Organ Culture», 3, pp. 359-373.
- FILOTICO F., CARPUTO D., BARONE A. (1995): *2n pollen production in Solanum phureja-S. tuberosum hybrids*, «Journal of Genetics & Breeding», 49, pp. 255-260.
- GOFF ET AL. (2002): *A Draft Sequence of the Rice Genome (Oryza sativa L. ssp. japonica)*, «Science», 296, pp. 92-100.
- HARLAN J.R., DE WET J.M.J. (1975): *On Ö. Winge and a prayer. The origins of polyploidy*, «Botanical Reviews», 41, pp. 361-390.
- JOHNSTON S.A., DEN NIJS T.P.M., PELOQUIN S.J., HANNEMANN R.E. JR (1980): *The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses*, «Theoretical and Applied Genetics», 57, pp. 5-9.
- KHAN N., ZHOU S., RAMANNA M.S., ARENS P., HERRERA J., VISSER R.G.F., VAN TUYL J.M. (2009): *Potential for analytic breeding in allopolyploids: an illustration from Longiflorum x Asiatic hybrid lilies (Lilium)*, «Euphytica», 166, pp. 399-409.
- LEITCH A.R., LEITCH I.J. (2008): *Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants*, «Science», 320, pp. 481-483.
- MASON A.S., NELSON M.N., YAN G., COWLING W.A. (2011): *Production of viable male unreduced gametes in Brassica interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures*, «BMC Plant Biology», 11, pp. 103-116.
- OTTO S.P., WHITTON J. (2000): *Polyploid incidence and evolution*, «Annual Review of Genetics», 34, pp. 401-437.
- RAMANNA M.S., JACOBSEN E. (2003): *Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review*, «Euphytica», 133, pp. 3-8.
- VISION T.J., BROWN D.G., AND TANKSLEY S.D. (2000): *The origins of genomic duplications in Arabidopsis*, «Science», 290, pp. 2114-2117.

## Maschiosterilità ed eterosi nelle varietà ibride: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica

### INTRODUZIONE

L'eterosi, a distanza di un secolo dalla sua scoperta, rappresenta ancora oggi il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura che può essere sfruttato nel miglioramento genetico delle varietà coltivate attraverso la costituzione di ibridi. Il termine eterosi [*heterosis*] indica l'esplosione di vigore che si osserva nelle progenie di particolari incroci tra linee pure o inbred, e che si manifesta come superiorità del valore fenotipico dei genotipi ibridi rispetto a quello dei loro genotipi omozigoti parentali (fig. 1).

Il fenomeno, descritto anche come vigore ibrido ed evidente soprattutto nelle specie prevalentemente allogame, può essere considerato l'opposto del deterioramento di vigore che accompagna l'autofecondazione o la fecondazione incrociata tra individui imparentati (depressione da *inbreeding*). In generale, l'eterosi si manifesta non solo come maggiore vigore vegetativo e riproduttivo – lussureggiamento – dell'ibrido rispetto alle linee parentali ma anche come maggiore velocità di sviluppo, quantità di biomassa, qualità del prodotto, resistenza ad agenti biotici e a stress abiotici, robustezza della pianta o qualsiasi altra caratteristica agronomicamente utile. Il grado di eterosi è funzione della diversità genotipica delle linee impiegate nell'incrocio. Per i caratteri quantitativi, l'eterosi (H) è misurata come differenza tra la media della progenie  $F_1$  e la media delle due linee parentali (P):

$$H = \bar{F}_1 - \bar{P}$$

\* Laboratorio di Genetica e Genomica delle Piante, DAFNAE – Università di Padova

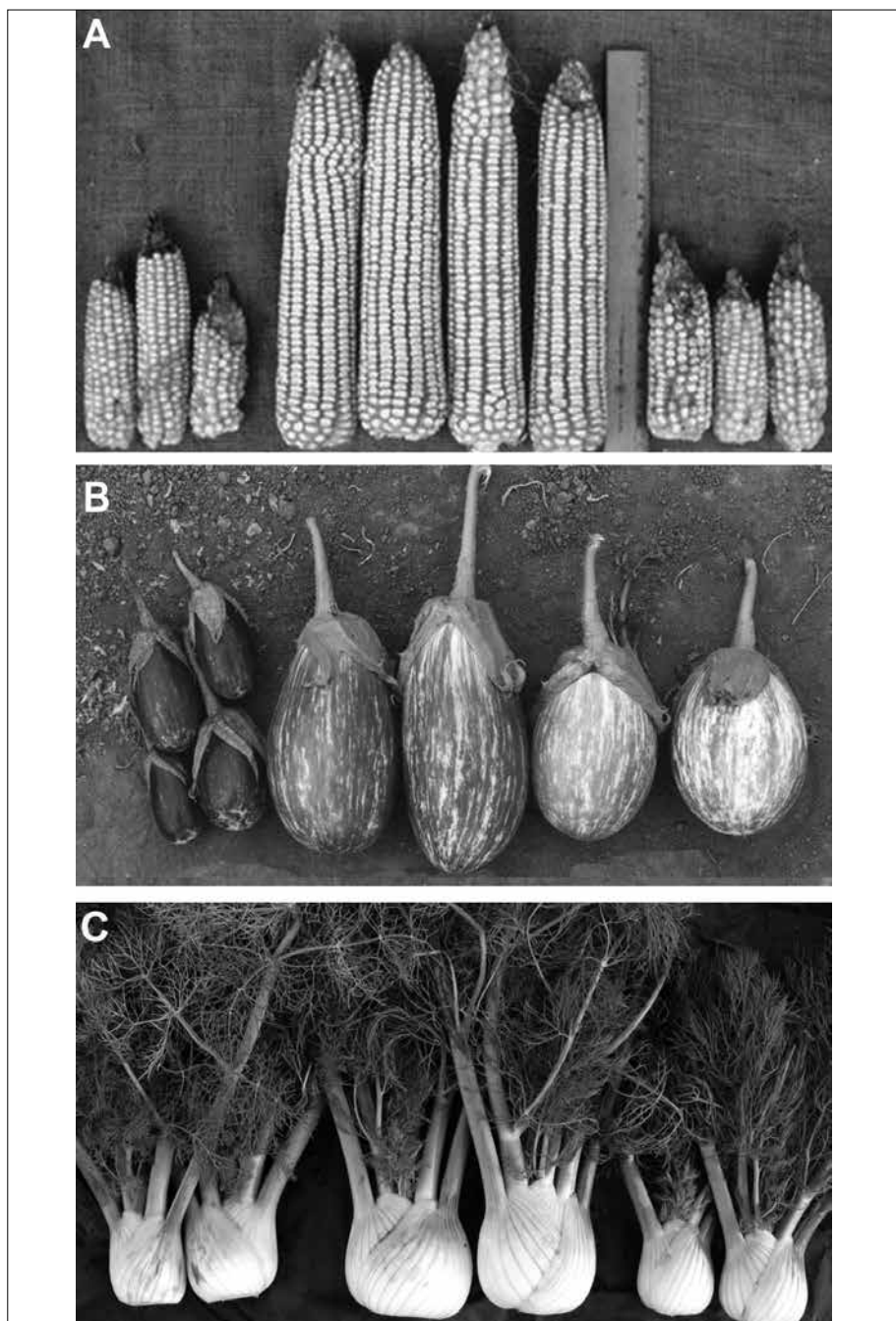


Fig. 1 *Manifestazione fenotipica del vigore eterotico di ibridi  $F_1$  di mais (A), melanzana (B) e finocchio (C) rispetto alle linee omozigoti parentali*

Il grado di eterosi varia in relazione alla specie e al suo sistema riproduttivo. Ad esempio, l'eterosi per la produzione di seme è mediamente pari al 120-130% in mais, 30-50% in colza, 36-55% in riso e circa 9% in frumento.

L'eterosi viene sfruttata in molte specie con la costituzione e la coltivazione di varietà ibride. Le ragioni che spingono a intraprendere programmi di costituzione di varietà ibride e che fanno della costituzione di varietà ibride la scelta strategica più appropriata sono molteplici: i) la produttività delle varietà ibride è maggiore rispetto a quella degli altri tipi possibili di varietà (ad esempio, sintetiche); ii) la produzione di seme ibrido  $F_1$  dà la possibilità di accumulare a livello genomico diverse caratteristiche agronomicamente vantaggiose utilizzando un unico genotipo; iii) l'uniformità genetica degli ibridi  $F_1$  e la segretezza che può essere riservata alle linee parentali facilita la tutela dei diritti del costitutore, stimolando così il coinvolgimento del settore privato in programmi di miglioramento genetico che sono spesso lunghi e molto costosi; iv) la costituzione di varietà ibride non è in contrapposizione con la necessità di preservare le risorse genetiche di specie di interesse agro-alimentare poiché la ricerca di linee inbred con alta attitudine alla combinazione specifica richiede l'esplorazione di ampie collezioni di germoplasma, forzandone il mantenimento.

Lo sfruttamento dell'eterosi in agricoltura è stato uno dei più grandi successi del miglioramento genetico vegetale: specie importanti come mais, pomodoro, girasole, sorgo e barbabietola sono attualmente coltivate nei Paesi occidentali quasi esclusivamente come varietà ibride. Le varietà ibride di riso stanno diffondendosi rapidamente in molti Paesi asiatici, soprattutto Cina. Anche molte altre specie di notevole importanza economica per l'Europa (ad esempio, segale, peperone, spinacio, carota, ecc.) sono coltivate come varietà ibride. Benché le varietà ibride siano ampiamente diffuse in agricoltura, l'eterosi che esse manifestano e che i miglioratori sfruttano da oltre mezzo secolo è un fenomeno non ancora chiaro sia in termini genetici che molecolari.

#### MASCHIOSTERILITÀ: SCOPERTA DI MUTANTI MASCHIOSTERILI E IL LORO IMPIEGO PER LA COSTITUZIONE DI VARIETÀ IBRIDE FI

La scoperta di barriere riproduttive sotto controllo genetico ha aperto la via alla costituzione di varietà ibride nelle specie di interesse agro-alimentare. Inoltre, le strutture fiorali hanno effetti fortemente influenzati da sistemi genetici che possono favorire o limitare un particolare tipo di fecondazione. Oltre al dioicismo, tra i meccanismi genetici più efficaci nel favorire o richiedere

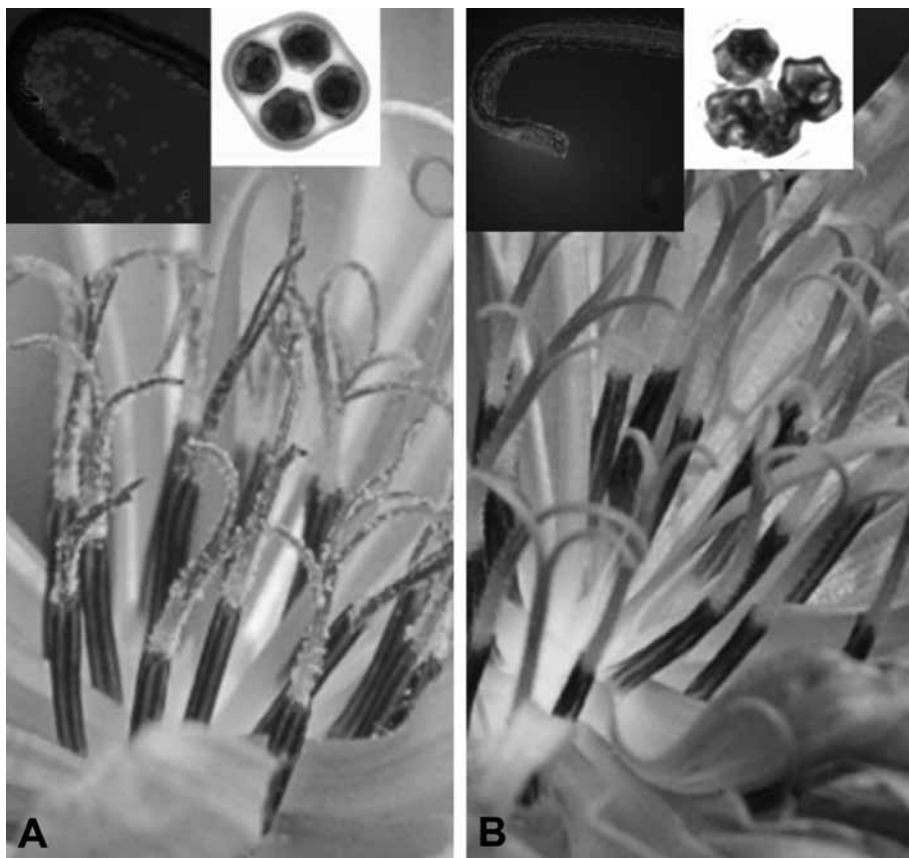


Fig. 2 Fiore di una pianta «wild-type» (A) e di un mutante «ms» (B) di radichio, con dettagli che evidenziano la presenza oppure assenza di granuli pollinici e la morfologia di una tetrade di microspore normali e non vitali

l'incrocio sono quelli che determinano la maschiosterilità e l'incompatibilità. Questi meccanismi si sono rivelati molto importanti per la costituzione di varietà ibride in molte specie ai fini dello sfruttamento dell'eterosi. Con l'incompatibilità, fenomeno molto diffuso in natura, il polline e gli ovuli sono funzionali e la mancata formazione di seme in presenza di impollinazione è legata a ostacoli fisiologici e morfologici che si oppongono alla fecondazione – unione dei gameti. Tuttavia, ciò che più di ogni altra cosa ha richiamato l'interesse degli operatori attivi nel miglioramento genetico delle specie vegetali è stata la maschiosterilità. La maschiosterilità consiste nella produzione di gameti maschili non funzionali e nella mancata produzione di gameti maschili e può essere controllata da geni nucleari, mitocondriali o da entrambi

i tipi. Nelle popolazioni naturali la maschiosterilità, a differenza dell'incompatibilità, non è un meccanismo comune tra le specie vegetali. La maschiosterilità, scoperta da F.V. Owen in barbabietola (*Beta vulgaris*) nel 1942, ha reso possibile la produzione commerciale del seme ibrido in molte specie (ad esempio, sorgo, girasole, pomodoro e barbabietola). Il radicchio rappresenta una delle ultime specie tra quelle di interesse agro-alimentare in cui sono stati identificati mutanti maschiosterili (fig. 2).

La maschiosterilità genetica è determinata da un singolo gene nucleare allo stato recessivo (*ms*): le piante maschiosterili hanno un genotipo *msms* e possono essere mantenute soltanto attraverso l'incrocio con piante maschioferti eterozigoti (*Msms*). Geni mitocondriali determinano la maschiosterilità citoplasmatica contraddistinta dalla trasmissione per via materna. In questo caso, le piante maschiosterili possiedono un particolare citoplasma sterile (*S*) e possono produrre seme solo se impollinate da piante con citoplasma normale (*N*). L'interazione dei fattori citoplasmatici e nucleari determina infine la maschiosterilità genetico-citoplasmatica: le piante con citoplasma *S* non sono necessariamente maschiosterili poiché la presenza di geni ristoratori (*Rf*) con sede cromosomica può ripristinare del tutto o in parte la fertilità maschile. Indipendentemente dalla natura del citoplasma (*S* o *N*), le piante che presentano geni ristoratori in singola o doppia dose risultano maschioferti.

Nella costituzione degli ibridi è fondamentale il controllo dell'impollinazione che si può realizzare con l'emasculazione manuale, meccanica, chimica oppure genetica. Nelle diverse specie compaiono saltuariamente dei mutanti maschiosterili che possono produrre seme solo se impollinate da individui maschioferti in grado di promuovere la fecondazione. La comprensione delle basi genetiche di questo fenomeno ha permesso di evitare l'emasculazione manuale delle piante portaseme nella produzione del seme ibrido con conseguente notevole riduzione dei costi. La maschiosterilità è da ritenersi quindi utile, anche se non necessaria, ai fini della produzione di seme ibrido di specie aventi strutture fiorali tali da rendere relativamente facile l'emasculazione manuale o meccanica (ad esempio, pomodoro e peperone). Le specie che presentano fiori con antere e stigmi più o meno intimamente associati o tali da rendere impossibile l'emasculazione meccanica e laboriosa quella manuale (ad esempio, girasole e sorgo) debbono, invece, assolutamente beneficiare della maschiosterilità affinché la produzione del seme ibrido sia economicamente possibile.

La maschiosterilità genetico-citoplasmatica è quella che meglio si presta alla costituzione delle varietà ibride in quelle specie dove il seme è il prodotto principale, come sorgo e girasole. Le linee inbred vengono rese maschiosterili

con un apposito programma di reincrocio nel quale il genitore donatore ha citoplasma che determina maschiosterilità ( $S$ ) ed è omozigote recessivo per il gene nucleare ristoratore ( $rfrf$ ), mentre il genitore ricorrente è rappresentato dalla buona linea inbred maschiofertile ( $N-rfrf$ ). Dopo alcune generazioni di reincrocio gran parte del genotipo della linea inbred sarà stato recuperato e il prodotto maschiosterile del reincrocio ( $S-rfrf$ ) rappresenterà il portaseme dell'ibrido a due vie: questa linea verrà mantenuta e moltiplicata incrociandola con la linea sorella maschiofertile ( $N-rfrf$ ) usata come impollinante. Per l'ottenimento dell'ibrido semplice si effettua un incrocio in cui il genitore maschile può avere citoplasma sia di tipo  $N$  che  $S$  in quanto nell'ibrido il citoplasma è fornito esclusivamente dalla linea femminile. Nel campo di produzione del seme è sufficiente che metà delle piante produca polline per assicurare la completa fecondazione delle piante portaseme. Nella catena di produzione del seme di un mais ibrido a due vie mediante la maschiosterilità genetico-citoplasmatica si dovranno quindi allestire tre campi geneticamente isolati: uno per mantenere e moltiplicare la linea inbred portaseme ( $S-rfrf \times N-rfrf$ ), uno per mantenere e moltiplicare la linea impollinante ( $S-Rf$  o  $N-Rf$ ) e uno per la produzione dell'ibrido semplice ( $S-rfrf \times S-RfRf$ ).

In alcune specie per le quali non si dispone di maschiosterilità genetico-citoplasmatica si può far ricorso alla maschiosterilità genetica. L'impiego della maschiosterilità genetica per la produzione di seme ibrido prevede l'adozione dello schema classico. Il seme che verrà raccolto sul portaseme sarà eterozigote ( $Msms$ ) e darà origine a piante tutte maschiofertili se l'impollinante è omozigote dominante ( $MsMs$ ). Qualora l'impollinante sia, invece, eterozigote, il seme che verrà raccolto sul portaseme darà origine a una progenie composta per metà da piante maschiosterili ( $msms$ ) e per l'altra metà da piante maschiofertili ( $Msms$ ). La maschiosterilità genetica si può conservare soltanto se la specie si propaga vegetativamente oppure attraverso la condizione eterozigote. In pratica una linea inbred maschiosterile ( $msms$ ) si può conservare incrociandola con la linea sorella maschiofertile eterozigote ( $Msms$ ), ottenendo così metà progenie maschiosterile ( $msms$ ) e metà maschiofertile eterozigote ( $Msms$ ). Nella costituzione degli ibridi le piante maschiosterili fungono, ovviamente, da portaseme e vengono alternate in file con quelle della linea maschiofertile impollinante. Nelle file portaseme la metà delle piante della linea inbred saranno maschiosterili e l'altra metà maschiofertili. Queste ultime debbono essere eliminate prima della fioritura, operazione praticamente possibile soltanto se il gene della maschiosterilità è pleiotropico o è strettamente associato a un gene che si manifesta fenotipicamente sempre prima della fioritura. Attualmente, in molte altre specie di interesse agro-alimentare,



si ricorre all'uso di uno o più marcatori molecolari strettamente associati al gene responsabile della maschiosterilità.

In alcune specie si ricorre, invece, alla maschiosterilità citoplasmatica. Anche in questo caso le piante maschiosterili usate come genitore femminile producono seme solo in presenza di un impollinante maschiofertile. Il seme ibrido prodotto darà però origine soltanto a piante maschiosterili in quanto il citoplasma dello zigote è fornito esclusivamente dalla pianta madre maschiosterile. Questo tipo di maschiosterilità è largamente utilizzato nella costituzione di varietà ibride in specie nelle quali il seme non rappresenta il prodotto principale, come ad esempio la cipolla.

#### BLOCCHI CROMOSOMICI O UNITÀ GENOMICHE DELLA TRASMISSIONE EREDITARIA

L'ipotesi formulata da Alfred H. Sturtevant e Thomas H. Morgan agli inizi del secolo scorso, secondo cui i crossing-over avvengono in siti casuali lungo i cromosomi, attualmente viene considerata valida solo parzialmente. Infatti, sono stati acquisiti moltissimi dati, per lo più in organismi modello di funghi, piante, insetti e mammiferi, che dimostrano l'esistenza nei cromosomi di *hot spots*, cioè di siti caldi di ricombinazione corrispondenti a regioni caratterizzate da frequenze di crossing-over nettamente più alte rispetto a quelle di altre regioni.

In linea generale, la dimensione dei cromosomi riflette comunque la frequenza dei crossing-over che possono verificarsi. La relazione tra la frequenza media di ricombinazione e la distanza genetica tra loci lungo il cromosoma, così come la relazione tra la frequenza media dei chiasmi e la dimensione genetica dei cromosomi, consentono di derivare la lunghezza complessiva delle mappe genetiche. Benché queste relazioni risultino piuttosto affidabili, in un genoma esistono in realtà regioni cromosomiche più frequentemente soggette di altre all'insorgenza di crossing-over che condizionano negativamente la corrispondenza tra mappa genetica e mappa fisica. Conseguentemente, le distanze genetiche, misurate in cM (unità di ricombinazione), non sempre corrispondono con precisione alle distanze fisiche, misurate invece in Mb (milioni di paia di basi).

In molte specie, il confronto tra la mappa fisica e quella genetica ha consentito di svelare discrepanze considerevoli relativamente alle distanze reciproche tra loci nonché differenze riconducibili a geni posizionati in maniera errata. In effetti, in tutte le specie le estremità dei cromosomi – telomeri – così

come le regioni adiacenti al centromero sono di regola meno interessate da eventi di scambio rispetto ad altre regioni sparse lungo i bracci cromosomici. In una mappa genetica le regioni fisiche meno interessate dalla ricombinazione risultano compresse, mentre quelle maggiormente coinvolte da eventi di ricombinazione appaiono espanse. Comunque, anche se la relazione tra mappa fisica e mappa genetica dei cromosomi non può ritenersi uniforme, le mappe genetiche e quelle fisiche di un cromosoma sono generalmente colineari, nel senso che i loci conservano lo stesso ordine. Il recente sequenziamento di interi genomi vegetali, oltre ad *Arabidopsis* quelli di specie agro-alimentari come riso, pomodoro, vite e pesco, consentirà di acquisire informazioni di rilievo anche sulla sintenia tra mappe di specie diverse. Ciò significa che, oltre all'ordine dei geni, potrà essere analizzata anche la composizione dei geni lungo i cromosomi e nell'ambito dei genomi.

L'analisi del genoma dei lieviti e dei mammiferi, ma anche di alcune piante, come ad esempio il mais, ha evidenziato l'esistenza di particolari elementi genetici, detti *cis-* e *trans-genetic modifiers*, in grado di regolare gli eventi di ricombinazione meiotica. In aggiunta a specifiche sequenze riscontrate in fase di associazione *cis* all'interno o nelle vicinanze dei punti caldi di ricombinazione, corrispondenti a elementi di regolazione del crossing-over, sono state individuate anche sequenze polimorfiche dislocate in fase di associazione *trans* e dovute a riarrangiamenti consistenti come delezioni, inserzioni e traslocazioni oppure a cambiamenti riguardanti la struttura della cromatina. Entrambi i tipi di fattori modificatori condizionano sia il grado di ricombinazione per unità di lunghezza fisica dei cromosomi che la distribuzione dei siti di ricombinazione nei singoli cromosomi.

Il fatto che i processi di crossing-over non coinvolgano regioni casuali lungo i cromosomi, ma che invece esistano siti preferenziali per la formazione dei chiasmi e per lo scambio di parti corrispondenti tra cromatidi di cromosomi omologhi ha dato concretezza all'ipotesi avanzata qualche decennio fa che l'eredità dipenda dalla ricombinazione di blocchi cromosomici (*chromosome blocks*) e non dalla ricombinazione di singoli geni.

Nelle specie a riproduzione sessuale i blocchi cromosomici rappresenterebbero le unità genomiche della trasmissione ereditaria. L'attività di miglioramento genetico agirebbe pertanto non sui singoli geni quanto invece sui blocchi cromosomici, intesi come complessi di geni associati nei segmenti risultanti dal crossing-over. Secondo tale interpretazione ogni cromosoma *crossover* sarebbe costituito dalla successione di blocchi di origine materna e paterna, il cui numero dipende dagli eventi di scambio verificatisi tra omologhi durante la meiosi. Nei blocchi cromosomici si possono trovare associati

geni che controllano caratteri qualitativi e complessi di poligeni per caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Il miglioramento dei caratteri complessi, controllati da molti geni, implica che con la selezione è necessario agire contemporaneamente su più blocchi cromosomici. Anche quando si è interessati all'introggressione di caratteri controllati da un singolo gene ciò che viene trasmesso è in realtà un blocco cromosomico più o meno esteso. Normalmente, di tale tratto cromosomico non si conosce la quantità di materiale genetico indesiderato che risulta associato col gene di interesse e che il miglioratore si porta necessariamente dietro (situazione nota come *linkage drag*).

Il numero di blocchi cromosomici di un organismo varia in funzione del numero delle coppie di cromosomi e della frequenza con la quale interviene lo scambio. Entrambi i fattori dipendono dalla specie, ma è verosimile che il numero dei blocchi cromosomici sia piuttosto limitato in ogni genoma. In generale, la ricombinazione dei geni associati si considera esplicata con uno o due eventi di scambio – *crossing-over* – conseguenti alla formazione di altrettanti chiasmi tra cromosomi di una coppia di omologhi. Poiché le posizioni interessate dal crossing-over possono variare in ciascuna meiosi, anche le associazioni geniche possono risultare diverse, ma ciò non influenza il numero complessivo di blocchi cromosomici che risulterà simile in tutti i gameti prodotti.

Nelle linee pure omozigoti a tutti i loci così come nelle linee inbred, la posizione del crossing-over non ha alcun effetto sulle associazioni tra geni e neanche sulle combinazioni di geni nei gameti. Nei materiali eterozigoti, invece, sia l'ordine dei geni nei gruppi di associazione che la composizione in alleli nei gameti risultano influenzati dalla posizione del crossing-over. Da un punto di vista pratico è importante conoscere quanti sono i blocchi cromosomici sui quali è possibile agire mediante la selezione nel corso di un programma di miglioramento genetico.

In mais ( $2n=2x=20$ ), assumendo due crossing-over e quindi tre scambi tra cromosomi di una coppia di omologhi si avrebbero 30 unità di trasmissione genetica per gamete, cioè 3 blocchi per ciascuno dei 10 cromosomi del complemento aploide. In erba medica ( $2n=4x=32$ ), assumendo un crossing-over, vale a dire due scambi, per coppia di cromosomi omologhi si avrebbero 2 blocchi per ciascuno dei 16 cromosomi del complemento diploide pari a 32 unità di trasmissione genetica per gamete. La frequenza degli eventi di ricombinazione, in termini di numero di chiasmi, è stata stimata per alcune delle più importanti specie di interesse agrario (tab. 1). Bisogna comunque considerare che il numero totale dei blocchi cromosomici (variabile tra 20 e 40) è molto piccolo rispetto al numero di geni presenti nel genoma di una specie (mediamente 25-30 mila).

| SPECIE                         | NO. DI CHIASMI<br>(INTERVALLO) | BLOCCHI CROMOSOMICI |       |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------|
|                                |                                | TOTALE              | MEDIO |
| <i>Brassica oleracea</i>       | 10,0-18,5                      | 29,6                | 3,3   |
| <i>Hordeum vulgare</i>         | 13,5-15,6                      | 22,7                | 3,2   |
| <i>Lactuca sativa</i>          | 14,6-20,7                      | 28,1                | 3,1   |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | 16,2-17,0                      | 25,5                | 2,1   |
| <i>Oryza sativa</i>            | 18,9-27,6                      | 36,7                | 5,2   |
| <i>Pisum sativum</i>           | 10,3-18,1                      | 29,3                | 4,2   |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | 13,2-14,1                      | 20,7                | 1,7   |
| <i>Zea mays</i>                | 17,4-25,0                      | 35,8                | 3,6   |

Tab. 1 Numero di chiasmi osservati a livello citologico e di scambi determinati a livello molecolare, e numero totale e medio di blocchi per ciascuno dei cromosomi del complemento aploide

I blocchi cromosomici influenzano la manifestazione dell'eterosi, condizionando l'azione e l'interazione genica. Nel 1917, Jones fu il primo a ipotizzare e riconoscere il ruolo dei blocchi cromosomici, proponendo la teoria della dominanza di fattori associati per spiegare il fenomeno eterotico. In termini genetici, tale situazione si basa sull'effetto cumulativo di geni dominanti associati in blocchi cromosomici. Negli anni che seguirono si ebbe un acceso dibattito circa il tipo di azione genica e il fenomeno eterotico venne da molti ritenuto espressione di vera e propria sovradominanza. Secondo questa teoria, l'azione genica ai singoli loci è tale che il fenotipo degli eterozigoti risulti superiore a quello di entrambi gli omozigoti.

Una importante considerazione da fare affrontando il tema delle azioni geniche è quella che un allele avente dominanza completa a volte possiede anche un effetto additivo rispetto a quello recessivo (cioè il valore fenotipico dell'allele recessivo non sempre è nullo). Inoltre, gli effetti di più alleli di loci diversi ma responsabili del controllo di uno stesso carattere quantitativo sono cumulativi a livello fenotipico. Sulla base di queste considerazioni, nel 1988 Hallauer e Miranda affermarono che l'eterosi è dovuta agli effetti cumulativi di alleli favorevoli aventi dominanza parziale o completa.

Per la comprensione degli effetti genetici connessi ai blocchi cromosomici sono importanti i concetti di equilibrio genetico e equilibrio gametico ai quali sono legati l'equilibrio delle frequenze alleliche e l'equilibrio delle fasi gametiche.

L'equilibrio genetico, secondo la legge di Hardy-Weinberg, si ha quando in una popolazione numerosa le frequenze relative degli alleli a un dato locus rimangono costanti nel corso delle generazioni e questo si realizza in assenza di fattori di disturbo (selezione, mutazione, migrazione) e in presenza di unioni casuali. Nelle specie diploidi, così come in quelle allopoliploidi (organismi a eredità disomica),

l'equilibrio genotipico viene raggiunto con una sola generazione di unioni casuali, vale a dire nella discendenza  $F_2$  di un ibrido oppure nella generazione  $Syn1$  di una sintetica. L'equilibrio gametico, spesso indicato anche come equilibrio delle fasi gametiche, corrisponde invece a una situazione di combinazione casuale nei gameti tra alleli di geni a loci diversi. Considerando due coppie alleliche e assumendo che le singole forme alleliche siano selettivamente neutrali, cioè non esercitano alcuna influenza sulla *fitness* degli individui che compongono la popolazione, all'equilibrio si formeranno quattro tipi di gameti con uguale frequenza (25%) e le sedici possibili combinazioni genotipiche saranno presenti ciascuna con frequenza pari a 6,25%. L'equilibrio viene pertanto raggiunto quando i gameti si formano dalla combinazione casuale degli alleli e i genotipi derivano dall'unione casuale dei gameti. In presenza di segregazione indipendente, in un diibrido  $AaBb$  i quattro tipi possibili di gameti  $AB$ ,  $Ab$ ,  $aB$  e  $ab$  si formeranno in proporzioni uguali fin dalla prima generazione, ma con i geni associati in fase *cis* ( $AB/ab$ ) nelle prime generazioni dopo l'incrocio prevarranno i gameti  $AB$  e  $ab$ , così come nel caso di geni associati in fase *trans* ( $Ab/aB$ ) prevarranno i gameti  $Ab$  e  $aB$ . Per alcune generazioni dopo l'incrocio, per effetto dell'associazione i quattro tipi di gameti possibili non si formeranno in proporzioni uguali ma prevarranno quelli parentali determinando quella situazione nota come disequilibrio di associazione. Pertanto se le due coppie alleliche sono associate, l'avvicinamento alla condizione di equilibrio è graduale. In alcuni casi può richiedere anche parecchie generazioni e, comunque, la velocità con cui viene raggiunto è funzione della frequenza di ricombinazione tra i due geni: maggiore è la distanza tra due geni lungo il cromosoma e minore è il numero di generazioni richieste per raggiungere l'equilibrio. I geni localizzati nei blocchi cromosomici sono in una situazione di disequilibrio di associazione nelle prime generazioni segreganti: l'equilibrio di associazione è raggiunto all'incirca in  $F_8$ , allo stato pratico, e in  $F_{16}$ , a quello teorico. Nelle specie autoploiploidi (organismi a eredità polisomica), come erba medica e patata, l'equilibrio genotipico viene raggiunto in maniera asintotica approssimativamente alla generazione  $F_{12}$ . L'equilibrio gametico è, invece, una situazione teorica poiché richiederebbe parecchie generazioni, molte più di quelle praticamente possibili nella maggior parte dei programmi di miglioramento genetico.

#### BASI GENETICHE DELL'ETEROSI: TEORIE DELLA DOMINANZA E DELLA SOVRADOMINANZA

Il termine “eterosi” è stato usato per la prima volta da George H. Shull nel 1916 come sinonimo di vigore ibrido, senza però fare riferimento ad alcun

meccanismo in particolare. Ancora oggi l'eterosi è considerato il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura sfruttato da oltre mezzo secolo senza conoscerne le basi genetico-molecolari.

Le basi genetiche dell'eterosi sono state oggetto di ampia discussione fin dai tempi delle prime osservazioni sul mais. Le evidenze sperimentali disponibili a quel tempo per formulare ipotesi genetiche erano sostanzialmente due: i) l'eterosi si manifesta come vigore ibrido in conseguenza dell'unione tra individui geneticamente diversi; ii) l'ibrido  $F_1$  risultante dall'incrocio tra individui omozigoti per alleli diversi evidenzia a livello fenotipico una media superiore a quella calcolata tra le due linee parentali o uguale alla media della migliore linea parentale (dominanza parziale o completa), e in qualche caso addirittura superiore alla media della migliore linea parentale (sovradominanza).

Già allora per spiegare l'eterosi furono avanzate due teorie basate su ipotesi contrapposte. Dapprima East nel 1908 e Shull nel 1912 ritennero che germoplasma geneticamente differenziato potesse determinare uno «stimolo fisiologico allo sviluppo tanto maggiore quanto più diversi sono i gameti coinvolti nella fecondazione». Secondo questa interpretazione, nota come ipotesi o teoria della sovradominanza, l'eterosi è connessa con la quota di eterozigosi dell'individuo ibrido che determina un vantaggio rispetto a entrambi gli omozigoti. Alternativamente, l'eterosi venne considerata la conseguenza del mascheramento di alleli recessivi deleteri trasmessi da uno dei parentali da parte delle forme dominanti, sia a livello parziale che totale, trasmesse dall'altro parentale dell'incrocio. Questa interpretazione, nota come ipotesi o teoria della dominanza, è stata formulata da Bruce nel 1910, con l'affermazione che «gli effetti di geni recessivi deleteri tendono a essere annullati dalla dominanza negli eterozigoti», anche se Keeble e Pellew, sempre nel 1910, sono stati in realtà i primi a parlare esplicitamente di ipotesi della dominanza.

Da un punto di vista storico, la tendenza costante è stata quella di attribuire il vigore eterotico che si manifesta nella progenie ibrida all'eterozigosi e quindi alle differenze nella composizione allelica tra i genotipi omozigoti delle linee parentali. Ancora oggi l'eterosi viene ritenuta un fenomeno biologico estremamente complesso e difficile da spiegare in termini genetico-molecolari, soprattutto a causa della sua natura multigenica. Le teorie classiche di genetica quantitativa formulate attorno ai concetti di dominanza e sovradominanza sono state riesaminate e affinate da diversi ricercatori verso la metà del secolo scorso.

Secondo l'ipotesi originale della dominanza, l'eterosi si manifesta quando nell'ibrido, a una serie di loci, l'allele dominante favorevole trasmesso da

una linea parentale maschera quello recessivo sfavorevole trasmesso dall'altra linea parentale. Ciò significa che alcune linee potranno integrarsi molto bene producendo ibridi migliori rispetto alla media delle possibili combinazioni di incrocio, mentre altre non saranno in grado di complementarsi a causa della sovrapposizione delle loro situazioni alleliche. A sostegno di questa idea c'è l'osservazione che l'eterosi è molto evidente quando si incrociano linee provenienti da popolazioni differenziate e meno evidente quando si incrociano linee imparentate. Secondo l'ipotesi della sovradominanza, l'eterosi è invece attribuibile a particolari interazioni alleliche a singoli loci presenti nell'ibrido e non possibili nelle linee parentali.

Entrambe le ipotesi genetiche consideravano effetti di dominanza, anche se di grado diverso, e non prevedevano effetti additivi. La lunga controversia tra l'ipotesi della dominanza e quella della sovradominanza quale principale spiegazione genetica dell'eterosi è stata molto spesso risolta tenendo conto di entrambe, pesandone l'importanza relativa a seconda del carattere considerato e della specie studiata. In mais, la specie allogama maggiormente studiata per la comprensione dell'eterosi, numerose evidenze sperimentali acquisite in anni recenti da Hallauer e collaboratori indicano che la base genetica dell'eterosi è riconducibile prevalentemente alla complementazione funzionale di alleli con elevati effetti di dominanza. Questo significa che le due linee inbred usate nell'incrocio contengono alleli deleteri a un certo numero di loci e che nell'ibrido tali alleli vengono complementati da alleli superiori agli stessi loci trasmessi alternativamente dall'una e dall'altra linea parentale.

La teoria della dominanza implica che i geni recessivi siano meno favorevoli di quelli dominanti determinando così effetti negativi nelle linee inbred e il loro mascheramento comporterebbe l'espressione del vigore eterotico negli ibridi. A sostegno di questo modo di vedere c'è il diverso effetto della selezione naturale e il diverso livello di eterosi che si osserva nelle specie autogame e in quelle allogame. In tutte le popolazioni sia di specie autogame che allogame, gli alleli deleteri vengono rapidamente eliminati se dominanti. Gli alleli deleteri recessivi, invece, nelle specie autogame vengono eliminati dalle popolazioni perché raggiungono la condizione omozigote, mentre nelle specie allogame vengono conservati nelle popolazioni in condizione eterozigote. Ciò spiegherebbe perché l'eterosi, nelle specie autogame, non è un fenomeno così frequente e rilevante come nelle specie allogame.

Una delle prime critiche formulate alla teoria della dominanza sosteneva che in presenza di effetti di dominanza doveva essere possibile ottenere linee omozigoti con alleli dominanti a tutti i loci responsabili dell'eterosi e pertanto tanto vigorose quanto gli ibridi. Oltre al fatto che linee inbred di questo tipo

| Linea inbred 1 |   |    |   |     |   | Linea inbred 2 |   |    |   |     |   |
|----------------|---|----|---|-----|---|----------------|---|----|---|-----|---|
| Cromosoma      |   |    |   |     |   | Cromosoma      |   |    |   |     |   |
| I              |   | II |   | III |   | I              |   | II |   | III |   |
| A              | A | m  | m | W   | W | a              | a | M  | M | w   | w |
| b              | b | N  | N | x   | x | B              | B | n  | n | X   | X |
| C              | C | o  | o | Y   | Y | c              | c | O  | O | y   | y |
| d              | d | P  | P | z   | z | D              | D | p  | p | Z   | Z |

| Ibrido F <sub>1</sub> |   |    |   |     |   |
|-----------------------|---|----|---|-----|---|
| Cromosoma             |   |    |   |     |   |
| I                     |   | II |   | III |   |
| A                     | a | m  | M | W   | w |
| b                     | B | N  | n | x   | X |
| C                     | c | o  | O | Y   | y |
| d                     | D | P  | p | z   | Z |

Fig. 3 *Modello dei fattori genetici dominanti associati in blocchi cromosomici, secondo D.F. Jones (1917). Una linea inbred avente sei loci omozigoti per alleli dominanti e altrettanti loci omozigoti per alleli recessivi associati tra loro in fase «trans» quando incrociata con un'altra linea inbred avente agli stessi loci alleli complementari produce un ibrido F<sub>1</sub> con tutti e 12 i loci considerati che presentano alleli dominanti*

non sono mai state ottenute sperimentalmente, ai sostenitori di tale critica venne anche fatto notare che nel caso di molti geni coinvolti sarebbe risultato teoricamente impossibile accumulare tutte le forme alleliche migliori in una singola linea inbred a causa dell'associazione nei cromosomi di alleli deleteri di alcuni geni con alleli superiori di altri geni. La ricombinazione necessaria per concentrare nei singoli cromosomi tutti gli alleli favorevoli avrebbe infatti richiesto una serie numerosa di crossing-over, peraltro non facili da controllare o anche semplicemente da verificare.

Un'altra critica all'ipotesi della dominanza muoveva dalla considerazione che nelle popolazioni F<sub>2</sub> la distribuzione dei genotipi in base al vigore non era distorta come invece atteso per effetto della presenza di 3 fenotipi dominanti contro 1 di recessivi.



In risposta alle obiezioni sollevate dalla comunità scientifica, nel 1917 Jones asserì che in presenza di associazione stretta tra geni le due ipotesi non sarebbero tra loro distinguibili, così come nel caso di molti geni coinvolti, anche in assenza di associazione. In altri termini, ciò che è riconducibile alla sovradominanza può in realtà essere un effetto spiegabile anche con la dominanza di geni strettamente associati. La frase «la dominanza di fattori genetici associati può spiegare l'eterosi» scritta da Jones quasi un secolo fa si può considerare ancora valida nei contenuti. Il modello di geni associati in blocchi cromosomici postulato da Jones è schematizzato in figura 3 assumendo due distinte linee inbred omozigoti per alleli diversi a dodici distinti loci di tre ipotetici cromosomi.

In questo modello, ogni cromosoma delle tre coppie di omologhi possiede due loci con alleli dominanti e altrettanti con alleli recessivi, associati in fase *trans*. Gli alleli ai loci considerati risultano tra loro complementari, nel senso che se in una linea a un dato locus si ha omozigosi per l'allele dominante, nell'altra linea allo stesso locus si ha omozigosi per l'allele recessivo. L'ibrido  $F_1$  ottenuto dall'incrocio di queste linee inbred mostra così un allele dominante in ciascuno dei loci – blocchi cromosomici – considerati per un totale di dodici loci aventi alleli dominanti. L'effetto complessivo è che nell'ibrido si hanno alleli dominanti a un numero di loci che è doppio rispetto a quello si osserva in ciascuna delle linee parentali. Pertanto, anche in presenza di dominanza semplice ai singoli loci, il risultato è che l'ibrido appare superiore a entrambi i genotipi omozigoti di partenza. Il fenomeno per il quale il valore fenotipico dell'eterozigote supera quello di entrambi gli omozigoti a causa della complementazione di alleli recessivi deleteri associati ad alleli dominanti in fase *trans* è stato indicato con il termine di pseudo-sovradominanza.

L'ipotesi di Jones è elegante, riconosce l'esistenza di blocchi cromosomici come unità genomica della trasmissione ereditaria e attribuisce il vigore eterotico all'effetto cumulativo di geni con azione dominante. In tempi recenti è stato dimostrato che il crossing-over non è un fenomeno pienamente casuale e che nei cromosomi esistono realmente blocchi delimitati da “punti caldi” caratterizzati da eventi preferenziali di crossing-over, dei quali per lungo tempo si è negata l'esistenza.

La semplice complementazione di alleli recessivi e dominanti non dà comunque ragione dei risultati pratici ottenuti fino a ora. Negli ultimi decenni le linee inbred sono state considerevolmente migliorate e nonostante ciò il grado di manifestazione dell'eterosi non è diminuito ma è lentamente e progressivamente aumentato. Se l'eterosi fosse effettivamente dovuta al mascheramento di alleli deleteri da parte di alleli dominanti, assumendo che nell'ar-

co di oltre mezzo secolo di selezione le linee inbred siano state purificate dalla maggior parte delle forme alleliche negative, l'ammontare assoluto dell'eterosi manifestata dagli ibridi avrebbe dovuto mostrare un certo declino. L'attività di selezione delle linee inbred ha permesso invece un netto incremento del vigore ibrido. In sostanza, il miglioramento genetico delle linee inbred ha aumentato il divario produttivo tra linee inbred e ibridi, anziché diminuirlo come era logico attendersi. L'attenzione dei *breeder* è rimasta pertanto concentrata nel miglioramento delle linee inbred e molto meno è stato fatto per incidere direttamente sulle manifestazioni eterotiche. In ogni caso, il valore di due linee inbred non consente di predire il valore dell'ibrido in termini di eterosi poiché questo può essere determinato unicamente valutando le prestazioni del loro prodotto di incrocio. Infatti, solo attraverso l'incrocio semplice è possibile avere indicazioni sull'attitudine alla combinazione specifica (ACS) delle linee inbred. La conoscenza di tale attitudine, che indica il comportamento di un genotipo in una particolare combinazione di incrocio, è fondamentale per la selezione delle linee inbred da utilizzare nella costituzione di una varietà ibrida.

Nel complesso, le osservazioni condotte in mais sul miglioramento del vigore ibrido ottenuto nel corso degli anni suggeriscono due possibili interpretazioni genetiche: i) accumulazione nelle linee inbred di alleli favorevoli a un certo numero di loci dove risiedono geni fondamentali, non direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi; ii) sostituzione nelle linee inbred degli alleli deleteri con quelli superiori ai loci che controllano direttamente processi fisiologici alla base dell'eterosi.

La contrapposizione tra la teoria della dominanza e quella della sovradominanza non è ancora risolta. Molto spesso si parla ancora oggi di sovradominanza ma molti ricercatori hanno messo in evidenza nel mais che le stime della varianza genetica attribuibile alla dominanza che superano quelle teoriche potrebbero essere dovute sia alla sovradominanza che al disequilibrio di associazione di alleli favorevoli in fase *trans* a loci localizzati in blocchi cromosomici (pseudo-sovradominanza). Il confronto tra i livelli di dominanza stimati in popolazioni  $F_2$ , in disequilibrio, con quelli stimati in popolazioni comprese tra la  $F_8$  e la  $F_{16}$ , in equilibrio, ha evidenziato che l'effetto della dominanza si riduce rapidamente nelle prime generazioni segreganti e in modo più lento, ma progressivo, avvicinandosi alla situazione di equilibrio gametico. Tali risultati avvalorano l'ipotesi della dominanza, dimostrando che l'eterosi nelle prime generazioni segreganti è verosimilmente dovuta a fattori genetici dominanti in condizione di disequilibrio di associazione.

STUDIO DELL'ETEROSI NELL'ERA GENOMICA:  
STATO DELL'ARTE A LIVELLO MOLECOLARE

Allo stato attuale delle conoscenze sembra importante sottolineare che un contributo importante, forse definitivo, alla comprensione dell'eterosi possa venire dallo studio delle situazioni geniche, chimiche e metaboliche reso possibile dalle moderne tecnologie. In sostanza quello che fino a oggi ha potuto essere discusso solo in via ipotetica potrà essere considerato all'origine analizzando i fatti genetico-molecolari che differenziano le varie situazioni.

I termini dominanza e sovradominanza che sono alla base delle teorie che hanno dominato la scena fino a oggi non sottintendono ovviamente alcun meccanismo genetico-molecolare perché entrambe le teorie sono state formulate molto prima che il materiale ereditario venisse identificato negli acidi nucleici.

Un primo contributo che la genetica moderna ha potuto fornire per la comprensione dell'eterosi riguarda lo studio dei loci che controllano i caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Nuove informazioni, probabilmente determinanti per la comprensione dell'eterosi, vengono acquisite attraverso lo studio dei modelli di espressione genica, in relazione al dosaggio allelico e all'azione o all'interazione di fattori regolatori.

Fino a pochi anni fa, a causa del limitato numero di marcatori genetici disponibili, era estremamente difficile determinare i meccanismi ereditari alla base della trasmissione e della manifestazione dei caratteri quantitativi. Attualmente, la disponibilità di mappe genetiche sature di marcatori molecolari consente di identificare e localizzare con precisione le regioni cromosomiche dove risiedono i geni che determinano un carattere quantitativo. Quasi tutti i QTL descritti nelle specie vegetali in realtà non riflettono un singolo locus mendeliano ma un tratto cromosomico che verosimilmente si identifica, in tutto o in parte, con quelli che abbiamo chiamato blocchi cromosomici. Inoltre, secondo recenti acquisizioni riguardanti una serie di marcatori molecolari strettamente associati a QTL in specie diverse, una stessa regione cromosomica è in grado di controllare più caratteri quantitativi. I risultati in favore di una proprietà pleiotropica di alcuni QTL, capaci di influenzare due o più caratteri diversi e apparentemente non correlati tra loro, suggeriscono che la selezione naturale abbia portato alla creazione di regioni cromosomiche con geni strettamente associati che raramente ricombinano e che verosimilmente determinano la capacità adattativa e riproduttiva. Il dato più sorprendente è che per la maggioranza dei caratteri quantitativi studiati il numero di QTL è piuttosto basso, con un numero medio attorno a una decina di loci. Poiché

è improbabile che caratteri complessi come sono molti caratteri quantitativi possano dipendere da così pochi poligeni, si può ipotizzare che nei materiali geneticamente migliorati attualmente disponibili molti alleli favorevoli risultino fissati in tutte le linee esaminate. In questo modo l'azione degli alleli ai QTL di maggiore rilevanza agronomica sarebbe sottostimata e il vigore ibrido chiamerebbe in causa la dominanza di alleli ad altri loci, magari più direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi.

I modelli genetici evocati per spiegare l'azione e l'interazione dei geni compresi nei QTL vanno dall'addittività, alla dominanza e all'epistasia. Non è da escludere che tutte contribuiscano alle manifestazioni eterotiche, ma resta alla biologia molecolare chiarire quali sono i processi biochimici che stanno dietro questi termini. Molti dei loci per i caratteri quantitativi mostrano assenza di dominanza o effetti di semi-dominanza. Ciò significa che il genotipo eterozigote per uno specifico QTL manifesta un fenotipo diverso da quello dei due omozigoti e spostato verso l'uno o l'altro degli omozigoti, benché sia stato dimostrato che il più delle volte l'eterozigote possiede un valore intermedio tra i due omozigoti.

In mais, la specie allogama maggiormente studiata per la comprensione dell'eterosi, l'individuazione di una pluralità di QTL che controllano un singolo carattere resa possibile dal mappaggio effettuato con l'uso di marcatori molecolari strettamente associati a questi loci, ha evidenziato l'esistenza di azioni geniche diverse, prevalentemente intralocus dovute a dominanza sia completa che parziale, ma anche a sovradominanza e pseudo-sovradominanza. Tuttavia, l'esistenza di sovradominanza è stata molto spesso ricondotta a fenomeni di pseudo-sovradominanza, derivanti da alleli dominanti associati in fase *trans*. Infine, in un limitato numero di casi sono stati riscontrati anche effetti di epistasia attribuibili soprattutto a interazioni tra alleli di loci associati.

In riso l'analisi dei QTL mediante marcatori molecolari ha messo in evidenza che in questa specie la principale base genetica dell'eterosi è costituita dalla dominanza, sia totale che parziale: gli individui ibridi con i loci allo stato eterozigote hanno mostrato, per i singoli caratteri quantitativi presi in esame, un fenotipo uguale o intermedio rispetto a quello delle rispettive linee pure parentali. La mancanza di correlazione tra il valore fenotipico dei caratteri quantitativi studiati e il grado di eterozigosi, così come la presenza di alcune linee pure della generazione  $F_8$  aventi valori fenotipici per tutti i caratteri quantitativi esaminati superiori a quelli degli ibridi  $F_1$  hanno permesso di escludere qualsiasi azione genica prevalente di sovradominanza. Infine, non è mai stata rilevata epistasia tra le regioni cromosomiche dove sono stati mappati i marcatori molecolari strettamente associati ai QTL.

In frumento, un'altra specie autogama, i dati sperimentali sui QTL acquisiti ricorrendo all'uso dei marcatori molecolari suggeriscono che l'eterosi è compatibile con l'ipotesi della dominanza, con effetti di interazione tra geni di loci associati.

Un contributo decisivo che la genetica moderna sta fornendo per la comprensione dell'eterosi riguarda l'analisi dell'espressione genica. Sulla espressione genica negli ibridi si possono immaginare due livelli distinti riconducibili alle teorie genetiche che sono state qui discusse. Nel primo modello, si può ritenere che quando due alleli diversi di un dato gene, ciascuno trasmesso da una linea parentale, sono ereditati insieme nell'ibrido ciò determini una espressione simile a quella di uno dei genotipi omozigoti (dominanza completa) o compresa tra quelle dei genotipi omozigoti (additività o dominanza incompleta). Nel secondo modello, invece, si può pensare che la presenza di due alleli diversi allo stesso locus comporti una loro interazione in grado di innescare una espressione genica deviante rispetto a quella prevista sulla base dei dati relativi alle linee parentali omozigoti (sovradominanza). Tra le questioni che si pongono a livello molecolare alcune sembrano avere un'importanza preminente per le conseguenze che possono provocare negli ibridi.

In che misura differiscono, dal punto di vista nucleotidico, le forme alleliche alternative di un gene e, soprattutto, quali sono i livelli di efficienza trascrizionale? Qual è il livello funzionale delle proteine codificate dalle possibili varianti alleliche a un dato locus? Tutti gli alleli possono essere considerati trascrizionalmente attivi e in grado di presiedere alla sintesi di proteine metabolicamente funzionali? Oppure è verosimile che alcuni alleli di specifici geni possano non venire trascritti e/o tradotti oppure che il prodotto di questi alleli non sia funzionale?

Recentemente sono state messe a punto tecniche molto precise per l'analisi quantitativa dell'espressione genica a singoli loci mediante Real-Time PCR amplificando cDNA con primer allele-specifici disegnati in corrispondenza delle regioni conservate fiancheggiando polimorfismi di tipo SNP e In/Del. I dati acquisiti per molti geni indicano che negli ibridi il livello dei loro trascritti è significativamente diverso dalla media dei livelli dei trascritti osservati nelle corrispondenti linee omozigoti parentali. Dati simili di espressione genica sono stati riscontrati anche per il livello delle proteine, dimostrando pertanto che nell'ibrido insorgono realmente cambiamenti sostanziali rispetto alle linee inbred. In mais, l'analisi dell'espressione di geni codificanti per zeina dell'endosperma ha evidenziato nella maggior parte degli ibridi un livello di espressione genica due volte superiore oppure inferiore rispetto al livello medio delle linee omozigoti parentali. Risultati analoghi sono stati ottenuti,

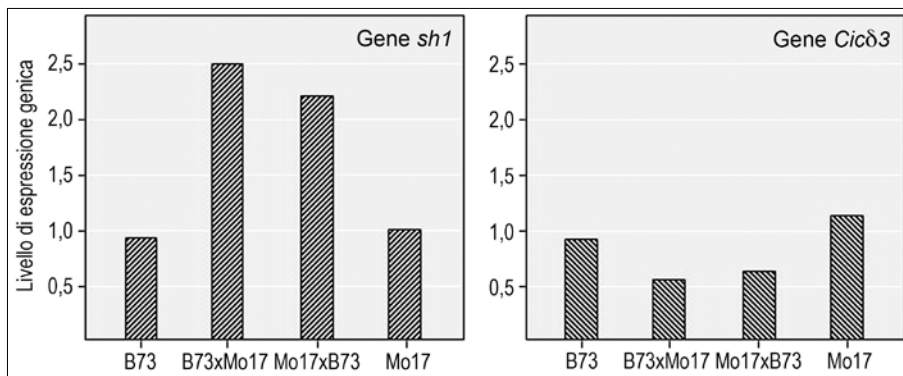


Fig. 4 Livelli di espressione dei geni saccarosio-sintasi «sh1» («Shrunken1») e ciclina  $\delta 3$  («Cyclin delta-3») di mais nelle linee inbred parentali e nei loro ibridi

sempre nell'endosperma di mais, studiando i profili di espressione di migliaia di geni. Ancora più recentemente, l'analisi condotta sull'espressione di decine di geni in ibridi di mais ha confermato che una quota consistente di questi geni non mostra livelli di trascrizione riconducibili a un modello additivo e che negli ibridi l'espressione dei geni è frequentemente repressa oppure potenziata (fig. 4).

Modelli di espressione genica non additivi sono stati confermati in mais analizzando ibridi triploidi ed effettuando confronti con quelli diploidi. In particolare, lo studio dei livelli di espressione in diversi genotipi ibridi ottenuti incrociando linee inbred di diversa origine ha evidenziato risposte quantitative per lo più indipendenti dal dosaggio genico e genomico. Anche in cotone sono stati messi in evidenza contributi ineguali dei genomi parentali negli allopoliploidi di nuova sintesi, suggerendo che quando due diversi genomi sono riuniti insieme in un ibrido i livelli di espressione dei geni non sono prevedibili sulla base dei livelli di espressione degli stessi geni nei parentali.

Vari gruppi di ricerca hanno studiato i livelli di mRNA trascritti dagli alleli di specifici geni in plantule e spighe immature di ibridi di mais in momenti diversi del loro sviluppo, in condizioni normali e di stress idrico (siccità), e in relazione a diverse densità di coltivazione. La maggior parte dei geni studiati ha mostrato differenze significative dei livelli di mRNA, variabili dall'espressione ineguale di entrambi gli alleli (espressione biallelica) all'espressione di un singolo allele (espressione monoallelica). L'origine materna o paterna non ha influenzato, o ha influenzato in misura molto modesta, il rapporto tra le quantità di trascritti degli alleli. Uno dei risultati più importanti è comunque quello emerso dal confronto tra varietà ibride costituite in epoche diverse: gli

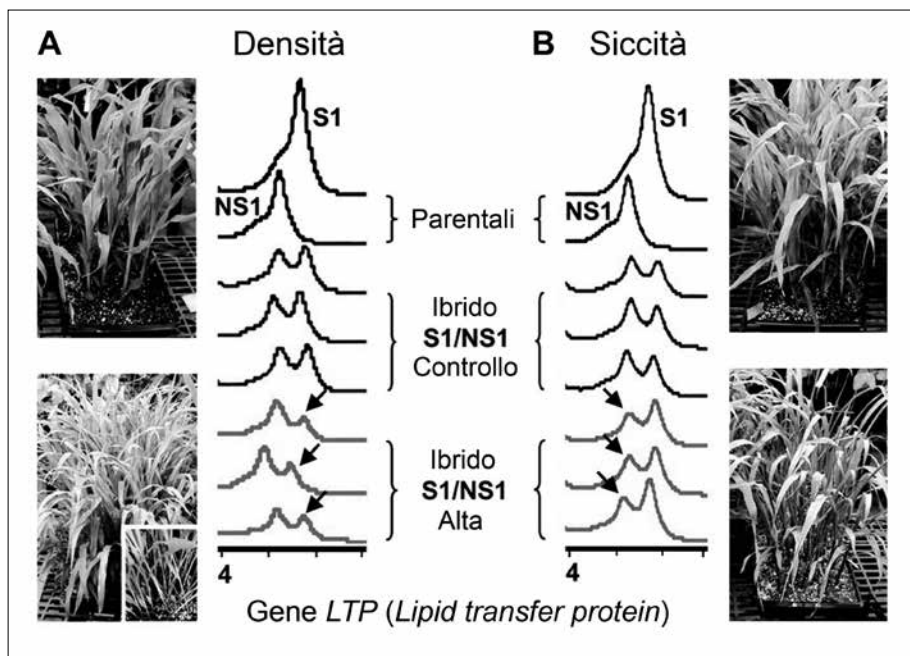


Fig. 5 Risultati ottenuti per il gene *LTP* («Lipid transfer protein») nelle linee inbred *S1* e *NS1* e nei loro ibridi: cambiamenti consistenti dei livelli di espressione negli ibridi rispetto alle linee parentali sono stati osservati sia in condizioni normali sia di stress (esempio, alta densità e siccità)

ibridi più moderni, derivanti da un'intensa attività di miglioramento genetico, hanno mostrato quasi esclusivamente una espressione di tipo biallelico mentre quelli più vecchi hanno evidenziato frequentemente una espressione di tipo monoallelico. Ancora più interessante è la risposta fatta registrare nelle diverse condizioni di stress abiotico (densità e siccità): negli ibridi i due alleli ai diversi loci studiati hanno evidenziato sempre una espressione differenziata e/o modulata (fig. 5).

Benché la modulazione dell'espressione genica negli ibridi rappresenti un'acquisizione che ha trovato molte conferme, anche in organismi diversi dal mais, ciò che non appare ancora chiaro è la sua relazione con l'eterosi: questi cambiamenti consistenti, sia in positivo che in negativo, dei livelli di espressione genica sono la causa dell'eterosi oppure sono la sua conseguenza?

Fino a oggi gli studi di espressione comparativa tra linee inbred e ibridi sono stati limitati a un numero ridotto di geni e a uno o pochi organi. Per la comprensione a livello genetico-molecolare dell'influenza dei livelli di espressione genica sull'eterosi appare determinante la possibilità di valu-

tare un numero di geni rappresentativo dell'intero genoma e più organi/tessuti vegetativi e riproduttivi a diversi livelli/stadi di sviluppo. La sfida sperimentale è quella di definire quali cambiamenti nell'espressione genica sono cruciali per promuovere il vantaggio dell'eterozigote. Poiché i caratteri che manifestano eterosi negli ibridi sono sotto controllo genetico complesso e solo raramente sono aumentati più di due volte in termini di valore fenotipico, cambiamenti relativamente modesti di molti geni possono giocare un ruolo importante in contrapposizione a cambiamenti consistenti di pochi geni.

Significativi al riguardo sono anche i dati che si vengono accumulando sulla struttura del genoma che fanno intravedere insospettite differenze tra i materiali che si incrociano.

Il confronto della struttura genomica di alcuni loci specifici in diverse linee inbred di mais ha evidenziato che le regioni intergeniche contengono tipi e combinazioni di trasposoni e retrotrasposoni diversi, e in posizioni diverse. Tale confronto ha, inoltre, evidenziato che le linee inbred sono diverse anche in termini di composizione genica: alcuni loci di una linea presentano geni non rinvenibili nelle regioni corrispondenti di un'altra linea, violando così la colinearità intraspecifica. Più recentemente, attraverso il confronto a livello genomico del contenuto genico e del polimorfismo allelico in cloni BAC delle linee inbred B73 e Mo17, è stato documentato il grado e il tipo di diversità intraspecifica esistente in mais, e riportato che le variazioni coinvolgono migliaia di sequenze soprattutto a causa di inserzioni di DNA. Inoltre, è stato dimostrato che il genoma di mais è in continua evoluzione poiché certi elementi trasponibili sono in grado di provocare variazioni a livello sia delle regioni codificanti che di quelle regolative attraverso meccanismi di duplicazione di singoli geni e di integrazione di porzioni di geni diversi. Tenendo conto di queste nuove acquisizioni, oltre a un effetto dovuto al dosaggio genico come possibile ipotesi alla base dell'eterosi, un'altra ipotesi possibile per il mais è quella che si basa sull'esistenza di regioni regolative nei trasposoni e nei retrotrasposoni in grado di fornire ampie e diverse possibilità di espressione genica modulata e/o di determinare silenziamento genico per effetto della presenza o meno di sequenze ripetute.

Un altro aspetto che è stato considerato recentemente in merito alla modulazione dell'espressione genica riguarda l'eventuale presenza negli ibridi di particolari effetti epigenetici. Tra questi la metilazione del DNA, i cambiamenti strutturali delle proteine istoniche e le variazioni del grado di impacchettamento della cromatina sono in grado di ripercuotersi profondamente sull'espressione genica.



## PROSPETTIVE E CONCLUSIONI

Da quando all'inizio del secolo scorso sono state formulate le prime ipotesi per spiegare il fenomeno dell'eterosi, questo argomento è stato costantemente presente nella ricerca internazionale anche se per lungo tempo l'attenzione è stata rivolta più alle conseguenze pratiche che al chiarimento delle sue basi scientifiche. Fino a quando il meccanismo di azione dei geni è rimasto ignoto non si è potuti andare oltre l'enunciazione di teorie, dominanza e sovradominanza in primo luogo, le quali hanno cercato di dare un nome a ipotetici processi piuttosto che delucidarli nella loro essenza, rimasta a lungo ignota.

Con la nascita della genetica molecolare, che ha ormai oltre mezzo secolo di vita, le possibilità offerte alla ricerca sono immensamente cresciute specialmente dopo che questa ha superato la fase iniziale volta a mettere a fuoco il modo nuovo di affrontare i problemi e ad accumulare dati sulle relazioni fondamentali tra fattori genetici e biochimismo cellulare. Durante questo periodo il lavoro pratico per lo sfruttamento dell'eterosi ha proceduto alacremenente e pur non potendo essere basato su puntuali conoscenze scientifiche ha dato i risultati prodigiosi che sono sotto gli occhi di tutti. Le prime acquisizioni di dati concernenti risultati pratici importanti e materiali innovativi messi a punto affidandosi più all'intuito dei ricercatori che non alle conoscenze scientifiche, da un lato, e le nuove acquisizioni relative all'organizzazione dei genomi e al loro funzionamento, dall'altro, hanno stimolato in tempi recenti un crescente interesse nei confronti dell'eterosi. Si sta in sostanza verificando quello che tante volte si è verificato nella storia della genetica: questa scienza si è proposta spesso di dar conto di risultati pratici e da questo lavoro ha tratto essa stessa motivi di progresso. In effetti, la pratica pone domande che non sempre trovano risposta nelle conoscenze acquisite, ma richiedono approfondimenti e verifiche di ipotesi nuove. In tema di eterosi, per lungo tempo si è dato credito all'ipotesi che gli ibridi mostrino complementazione dei differenti alleli trasmessi dai due genitori, in modo tale che i geni favorevoli di un genitore abbiano la capacità di compensare quelli sfavorevoli dell'altro genitore e viceversa. In termini di espressione genica sono state considerate due ipotesi alternative: 1) gli alleli possono operare nell'ibrido in modo completamente additivo e quindi mostrare un livello intermedio rispetto a quello dei parentali e 2) le interazioni tra i fattori regolatori dei due genitori alterano l'espressione genica ripercuotendosi sul fenotipo degli ibridi che non risulta intermedia rispetto a quella dei parentali. I risultati acquisiti supportano quest'ultima ipotesi.

Sperimentalmente le moderne tecniche di genomica e trascrittomica potrebbero rivelarsi molto utili per misurare l'espressione genica di singoli

alleli a specifici loci e quindi per verificare eventuali differenze in termini quantitativi, sia come espressione nei livelli assoluti dei prodotti genici nelle linee parentali e negli ibridi che come espressione modulata in relazione al tipo di tessuto o organo e al momento dello sviluppo. La tecnologia dei DNA *microarray* e quella di DNA *sequencing* di nuova generazione risultano infatti appropriate per determinare la capacità trascrizionale di complessi di geni o di singoli geni nelle linee inbred e la differenza assoluta esistente tra queste, nonché per prevedere la risposta eterotica negli ibridi in presenza di dominanza oppure per verificare e quantificare eventuali fenomeni di sovra-dominanza. Inoltre, per i membri di famiglie multigeniche, tali tecnologie possono anche risultare utili per analizzare la presenza di effetti di dosaggio genico a livello di espressione nelle linee inbred e nei loro rispettivi ibridi semplici o doppi.

Attenta considerazione va riservata alle recentissime acquisizioni in materia di evoluzione del genoma delle specie studiate perché i dati disponibili, se confermati, possono avere un impatto al momento non prevedibile.

L'opinione più diffusa vuole che la formulazione di un modello molecolare per l'eterosi debba iniziare con la verifica di ipotesi semplici e alternative così che sia possibile escluderne alcune e formularne altre più specifiche sulla base dei dati acquisiti. Il punto di partenza può essere rappresentato dall'analisi dell'espressione genica e della sua modulazione nei genomi di linee pure o di linee inbred al fine di effettuare valutazioni comparative con il comportamento dello stesso gruppo di geni nei genomi dei materiali ibridi. Al momento le informazioni disponibili su tali meccanismi non sono sufficienti per tentare di spiegare compiutamente l'eterosi a livello molecolare. Soltanto quando il fenomeno eterotico sarà pienamente delucidato, risulterà possibile manipolarlo anche a livello biotecnologico e sfruttarlo nel migliore dei modi in agricoltura.

Il percorso, non certo compiuto, riguardante i fattori regolatori e le reti regolatorie cui danno luogo, spingono a una visione olistica del fenomeno dell'eterosi che non può essere dovuto semplicemente alla somma di un numero, anche molto grande, di effetti genici, ma il prodotto finale di complesse azioni interattive (interattomica) e di specifiche reazioni metaboliche (metabolomica). Questo ragionamento vale non solo per l'eterosi, ma per ogni organismo vivente preso nella sua interezza. Ciò non toglie nulla alla possibilità di integrare il patrimonio genetico di singole specie con uno o pochi geni capaci di presiedere alla sintesi di molecole che direttamente possono migliorare la qualità dei prodotti o promuovere la capacità di resistenza o tolleranza nei confronti di specifici patogeni o stress ambientali.

## RIASSUNTO

L'eterosi, a distanza di un secolo dalla sua scoperta, rappresenta ancora oggi il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura che può essere sfruttato nel miglioramento genetico delle varietà coltivate attraverso la costituzione di ibridi. Le azioni e le interazioni dei geni associati nei blocchi cromosomici consentono di spiegare l'eterosi dei diploidi, l'eterosi fissata negli allopoliploidi di specie autogame, e l'eterosi progressiva negli autopoliploidi di specie allogame. Con l'avvento dell'era genomica, si cominciano ad acquisire informazioni cruciali per la comprensione dei meccanismi genetico-molecolari alla base della manifestazione del vigore eterotico nelle piante. Per la costituzione di varietà fondate sugli ibridi  $F_1$  è fondamentale il controllo dell'impollinazione, che si può realizzare con l'emasculazione genetica della linee portaseme, resa possibile dalla scoperta della maschiosterilità.

## ABSTRACT

Heterosis, after a century from its discovery, is still today the greatest biological phenomenon existing in nature that can be exploited for breeding plant varieties through the constitution of  $F_1$  hybrids. The actions and interactions of genes linked in chromosome blocks allow to explain heterosis in diploids, fixed heterosis in allopolyploids of selfing species and progressive heterosis in autopolyploids of outcrossing species. With the advent of the genomic era, experimental data are now shedding light on the genetic factors and molecular networks that control the expression of heterosis in plants. The discovery of male-sterility was crucial because it enables to control fertilization through the selection of pure lines or inbreds to be used as seed parent in controlled crosses with genetically divergent pollinators.

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO E APPROFONDIMENTO

- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte I: Inbreeding ed eterosi in relazione al sistema di unione. Dal Seme*, vol. 1, pp. 32-38.
- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte II: Blocchi cromosomici e basi genetiche dell'eterosi. Dal Seme*, vol. 1, pp. 39-48.
- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte III: Analisi dell'eterosi a livello molecolare. Dal Seme*, vol. 2, pp. 22-31.
- BARCACCIA G., FALCINELLI M. (2011): *Genetica e Genomica*, vol. 2 (seconda ed.), *Miglioramento genetico*, Liguori Editore, Napoli. pp. 314-736.
- BINGHAM E.T. (1998): *Role of chromosome blocks in heterosis and estimates of dominance and overdominance*, in *Concepts and breeding of heterosis in crop plants*, Crop Science Society of America, Madison, WI (USA), «CSSA Special Publ.», n. 25, pp. 71-87.
- BIRCHLER J.A., AUGER D.L., RIDDLE N.C. (2003): *In search of the molecular basis of heterosis*, «Plant Cell», 15 (10), pp. 2236-2239.

- BRUCE A.B. (1910): *The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor*, «Science», 32, pp. 627-628.
- CROW J.F. (1948): *Alternative hypotheses of hybrid vigour*, «Genetics», 33, pp. 477-487.
- CROW J.F. (1999): *Dominance and overdominance*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (ed. J.G. Coors, S. Pandey), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI (USA), pp. 49-58.
- DUVICK D.N. (1999): *Heterosis: Feeding people and protecting natural resources*, in *Genetics and exploitation of heterosis in crops* (J.G. Coors, S. Pandey ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 19-29.
- EAST E.M. (1908): *Inbreeding in corn*, «Rep. Connecticut Agric. Exp. Stn.», 1907, pp. 419-429.
- EAST E.M. (1936): *Heterosis*, «Genetics», 21, pp. 375-397.
- GUO M., RUPE M.A., ZINSELMEIER C., HABBEN J., BOWEN B.A., SMITH O.S. (2005): *Allelic variation of gene expression in maize hybrids*, «The Plant Cell», 16, pp. 1707-1716.
- JONES D.F. (1917): *Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis*, «Genetics», 2, pp. 466-479.
- LAMKEY K.R., EDWARDS J.W. (1999): *Quantitative genetics of heterosis*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (J.G. Coors, S. Pandey, ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 31-48.
- LONNQUIST J.H. (1980): *Heterosis: additivity versus dominance*, «An. Acad. Nac. Sci. Ex. Fis. Nat.» (Buenos Aires), 32, pp. 195-202.
- MELCHINGER A.E. (1999): *Genetic diversity and heterosis*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (J.G. Coors, S. Pandey, ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 99-118.
- MOLL R.H., LONNQUIST J.H., FORTUNA J.V., JOHNSON E.C. (1965): *The relation of heterosis and genetic divergence in maize*, «Genetics», 52, pp. 139-144.
- SHULL G.H. (1908): *The composition of a field of maize*, «Am. Breeders Assoc. Rep.», 4, pp. 296-301.
- STUBER C.W., LINCOLN S.E., WOLFF D.W., HELENTJARIS T., LANDER E.S. (1992): *Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers*, «Genetics», 132, pp. 823-839.
- TANKSLEY S.D. (1993): *Mapping polygenes*, «Annu. Rev. Genet.», 27, pp. 205-233.
- XIAO J., LI J., YUAN L., TANKSLEY S.D. (1995): *Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers*, «Genetics», 140, pp. 745-754.

## Conclusioni

La riproduzione sessuale è un processo fondamentale per la propagazione delle piante a fiore. Il ciclo vitale vegetativo delle piante inizia nel momento in cui i gameti maschile e femminile si fondono durante il processo noto come “doppia fecondazione”. Questo evento è di per sé importante da un punto di vista puramente biologico ma contiene inoltre numerosi aspetti applicativi; per questo motivo, lo studio dei processi riproduttivi nelle piante coltivate di maggiore interesse agricolo è di notevole importanza per lo sviluppo di un’agricoltura moderna e proiettata nel futuro. Gran parte delle nostre conoscenze di base sulla riproduzione sessuale nelle piante a fiore è derivata per molto tempo da informazioni di tipo morfologico (istologico, citologico e ultrastrutturale). Tuttavia, i progressi più recenti riguardanti la biologia molecolare della cellula vegetale hanno introdotto nuove tecniche sperimentali, maggiormente sofisticate e adeguate a indagare e micromanipolare le cellule riproduttive delle piante per vari scopi biotecnologici (es. induzione di aploidi, fecondazione in vitro, trasformazione del DNA). Infatti, la capacità di esprimere geni estranei utilizzando tecnologie transgeniche ha aperto interessanti opportunità per produrre grandi quantità di prodotti commercialmente importanti (industriali o farmaceutici) nelle piante. Queste tecnologie hanno reso possibile l’utilizzo di sistemi progrediti di agricoltura commerciale che sono stati sviluppati principalmente per la produzione di materie prime a scopi alimentari.

Studiare e migliorare il nostro grado di conoscenza dei meccanismi di riproduzione delle piante di interesse commerciale non è affatto secondario a questo scopo. Diversi processi biotecnologici applicati alle piante richiedono

\* *Università di Siena*

di superare o imporre barriere genetiche che favoriscano o impediscano il normale processo di riproduzione in modo da produrre nuovi ibridi oppure per stabilizzare un determinato carattere. In conseguenza di ciò, non sono da sottovalutare gli studi inerenti all'acquisizione di informazioni sui processi di crescita e sviluppo del gametofito maschile e femminile. In questo contesto, analizzare e comprendere la genomica associata alla riproduzione e l'individuazione di marcatori specifici di cellule destinate ai processi riproduttivi, rientra nel tentativo di definire, cellula per cellula, molecola dopo molecola, i processi che conducono alla formazione di fiori, gametofiti, gameti. Storicamente, uno dei principali attori di tale processo è sempre stato rappresentato dal tubetto pollinico. Questa cellula rappresenta non soltanto un ottimo modello da cui trarre importanti informazioni sui meccanismi di crescita delle cellule vegetali; comprendere i vari processi che regolano il suo sviluppo significa anche essere in grado di intervenire su questi meccanismi molecolari. In questo contesto, merita una menzione particolare lo studio dei processi riguardanti l'auto-incompatibilità e quindi il superamento delle barriere di auto-fecondazione. Dall'altra parte, lo studio dei processi che determinano lo sviluppo del gametofito femminile è altrettanto basilare. Anche se per parecchio tempo le difficoltà intrinseche di manipolazione diretta ha subordinato il gametofito femminile rispetto al polline, i recenti progressi nell'analisi genomica stanno rapidamente colmando questo divario tanto che è diventato fattibile analizzare il dialogo molecolare che si instaura tra polline germinato e sacco embrionale. Lo studio di processi importanti, quali l'incompatibilità (gametofitica e sporofitica), l'apomissi, e la maschio-sterilità, ha lo scopo di fornirci strumenti adeguati a comprendere l'enorme intreccio genetico e molecolare che regola il processo della riproduzione nelle piante a fiore. Al tempo stesso, dovrebbe consentirci di poter "manipolare" e controllare il meccanismo della riproduzione allo scopo di modificare i vari sistemi di coltivazione permettendo di combinare, completamente o parzialmente, genomi nucleari e citoplasmatici in modo da aggirare le barriere naturali dell'incompatibilità sessuale. Per esempio, la riproduzione asessuata attraverso semi o apomissia, con la produzione di cloni materni, rappresenta un enorme potenziale in agricoltura.

La giornata di studio che si è tenuta ai Georgofili ha permesso di approfondire i suddetti aspetti, mettendo in luce i più recenti progressi nei settori più applicativi della riproduzione delle piante a fiore. I vari relatori che si sono succeduti hanno permesso di delineare una visione della riproduzione sessuale nelle piante a fiore e come lo studio di questo meccanismo sia sempre maggiormente collegato ai bisogni un'agricoltura moderna.



Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel luglio 2013