

I GEORGOFILI

Quaderni
2009-III



GENOMICA PER LA VALORIZZAZIONE DI FRUMENTO DURO E POMODORO

Firenze, 12 giugno 2009



EDIZIONI POLISTAMPA

Con il contributo di



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2010
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»
Anno 2009 - Serie VIII - Vol. 6 (185° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

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

ISBN 978-88-596-0760-1

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

INDICE

<i>Introduzione</i>	7
ALESSIO APRILE, ANNA MARIA MASTRANGELO, ANNA MARIA DE LEONARDIS, GABOR GALIBA, ENRICA RONCAGLIA, FRANCESCO FERRARI, LUIGI DE BELLIS, LUANA TURCHI, GIOVANNI GIULIANO, LUIGI CATTIVELLI <i>Studio dei profili trascrizionali di frumento tenero e duro in risposta a stress idrico durante lo stadio di riempimento delle cariossidi</i>	9
ANTONIO DI MATTEO, ADRIANA SACCO, AMALIA BARONE <i>Un approccio innovativo per l'identificazione di geni coinvolti nella sintesi della vitamina C nel frutto di pomodoro</i>	51
DONATO PASTORE, MARIO SOCCIO, ELIDE FORMENTIN, FIORELLA LO SCHIAVO <i>Identificazione di un canale mitocondriale del potassio come possibile strumento per migliorare la resistenza agli stress abiotici in frumento duro</i>	65
GIAN PAOLO ACCOTTO, CARLA CARUSO, MARCO CATONI, FABRIZIO CILLO, GIANDOMENICO CORRADO, LUIGI DE MASI, MONICA DE PALMA, MARIA RAFFAELLA ERCOLANO, FRANCESCA FERRIELLO, LUIGI FRUSCIANTE, MATTEO LORITO, CONCETTA LOTTI, TIZIANA MASCIA, STEFANO PAVAN, FRANCESCO PENNACCHIO, SILVIA PROIETTI, GERARDO PUOPOLO, ROSA RAO, LUIGI RICCIARDI, MICHELINA RUOCCO, MARINA TUCCI, ASTOLFO ZOINA <i>Geni e network genici coinvolti nell'interazione pomodoro/ambiente biotico</i>	89

ALDO CERIOTTI, STEFANIA MASCI, DOMENICO LAFIANDRA <i>L'endosperma di frumento: una fabbrica per l'assemblaggio di macromolecole proteiche</i>	115
ROSA RAO, GIANDOMENICO CORRADO, STEFANO SFORZA, ROSANGELA MARCHELLI <i>Tracciabilità dell'identità genetica nella filiera agro-alimentare del pomodoro</i>	141
ANTONIO MORETTI, STEFANIA SOMMA, GIUSEPPINA MULÈ, CATERINA MORCIA, MARTINA SPINI, MICHELE A. STANCA, VALERIA TERZI <i>Biodiversità delle specie di Fusarium tossinogeniche coinvolte nella fusariosi della spiga di frumento duro: patogenicità, genetica, tossicità</i>	151
MARIA LUISA CHIUSANO, NUNZIO D'AGOSTINO, ALESSANDRA TRAINI, MIRIAM DI FILIPPO, LUIGI FRUSCIANTE <i>ISOL@: una piattaforma bioinformatica per l'analisi strutturale e funzionale del genoma del pomodoro</i>	173
AMEDEO ALPI <i>Commento di chiusura al Convegno</i>	187

Introduzione

AgroGen e *GenoPOM* sono due Laboratori Pubblico-Privati di genomica vegetale attivati in risposta al bando “FAR-Laboratori” del MIUR nel marzo 2005 e dedicati rispettivamente alla genomica del frumento duro e del pomodoro. La loro attività riguarda lo studio funzionale di geni e l’identificazione di marcatori molecolari associati a caratteri di rilevanza agronomica, e l’applicazione delle conoscenze genomiche ai fini del miglioramento genetico e della tracciabilità per rafforzare la competitività delle filiere italiane di frumento duro e pomodoro.

La Giornata di studio presenta i risultati conseguiti dai laboratori *AgroGen* e *GenoPOM* e costituisce un’opportunità per verificare le prospettive della genomica nel settore vegetale e la sua interazione con l’industria alimentare.

ALESSIO APRILE^{*,**}, ANNA MARIA MASTRANGELO^{***},
ANNA MARIA DE LEONARDIS^{***}, GABOR GALIBA^{****},
ENRICA RONCAGLIA^{*****}, FRANCESCO FERRARI^{*****},
LUIGI DE BELLIS^{**}, LUANA TURCHI^{*****}, GIOVANNI GIULIANO^{*****},
LUIGI CATTIVELLI^{***}

Studio dei profili trascrizionali di frumento tenero e duro in risposta a stress idrico durante lo stadio di riempimento delle cariossidi

INTRODUZIONE

Le piante di interesse agrario sono organismi che trascorrono la quasi totalità del loro ciclo vitale fissati a un substrato e come tali sono fortemente dipendenti dal loro habitat. Tuttavia le piante hanno colonizzato ambienti estremamente ostili dimostrando capacità di adattamento alle condizioni avverse.

La crescita e lo sviluppo delle piante dipendono dalle interazioni del genotipo con vari fattori esterni, come intensità luminosa, temperatura, disponibilità idrica, dei nutrienti, ecc. Ogni volta che nell'ambiente si verifica una variazione, in difetto o in eccesso, si parla di "stress" perché l'organismo vivente soggiace a modifiche potenzialmente dannose.

Tra i fattori abiotici, che hanno caratterizzato e continuano a caratterizzare l'evoluzione delle piante, la disponibilità d'acqua è senza ombra di dubbio il più importante. Lo stress idrico nel suo più ampio significato ingloba sia la carenza d'acqua che lo stress da salinità e parte dello stress da congelamento. Gli stress da siccità unitamente allo stress da basse temperature rappresentano il problema maggiore per l'agricoltura poiché di difficile controllo con le tecniche colturali e impediscono alla pianta di esprimere il suo potenziale produttivo.

* Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento
** CRA-Centro di Genomica e Post-Genomica, Fiorenzuola d'Arda, Piacenza
*** CRA-Centro di Ricerca per la Cerealicoltura, Foggia
**** Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvasar, Hungary
***** Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia
***** Dipartimento di Biologia, Università di Padova
***** ENEA-Centro di Ricerca Casaccia, Roma

È stato stimato che la quantità di acqua sulla terra è di 14 milioni di km³, e solo lo 0,003% di questi, circa 45.000 km³ sono definiti “fresh water resources”, acqua che teoricamente può essere destinata a uso potabile, per l'agricoltura e l'industria. Di questi solo 9.000-14.000 km³ sono disponibili per l'uso umano.

Nell'area mediterranea, che comprende 25 Paesi, 8 (con circa 115 milioni di abitanti) sono sotto la soglia minima di disponibilità idrica e i Paesi più esposti sono Spagna, Portogallo, Grecia e Italia. Inoltre si calcola che la desertificazione minacci direttamente 250 milioni di persone e indirettamente circa un miliardo (dati dal sito: www.fao.org). In questa prospettiva appare sempre più importante la razionalizzazione dell'uso dell'acqua sia attraverso le pratiche colturali che con l'ottenimento di genotipi tolleranti la carenza idrica e dalle spiccate attitudini nella WUE (water use efficiency) (Rizza et al., 2004).

Lo stress idrico determina un'ampia gamma di cambiamenti fisiologici e biochimici nelle piante. Dal punto di vista fisiologico le risposte delle piante hanno lo scopo principale di ridurre una ulteriore perdita di acqua per traspirazione, chiudendo gli stomi o reprimendo la crescita cellulare e della fotosintesi (Cattivelli et al., 2008). L'inibizione dell'espansione cellulare si verifica con un rallentamento dell'espansione fogliare e risulta uno dei primi meccanismi di risposta al deficit idrico. Un'area fogliare ridotta traspira meno, preservando e utilizzando acqua per un periodo più lungo.

La risposta allo stress inizia quando una pianta percepisce uno stress a livello cellulare. Il riconoscimento dello stress attiva le vie di trasduzione del segnale che trasmettono l'informazione all'interno delle singole cellule e in tutta la pianta. I cambiamenti dell'espressione genica che alla fine avvengono a livello cellulare sono integrati in una risposta da parte della pianta che può modificare la crescita e lo sviluppo e influenzare anche le capacità riproduttive. Non sono ancora completamente chiare le complesse vie di trasduzione del segnale che si pensa partecipino ai cambiamenti dell'espressione genica della pianta in risposta allo stress idrico. Tuttavia ci sono prove evidenti che indicano come la regolazione del segnale di risposta delle piante allo stress coinvolge gli ormoni, specialmente l'ABA, secondi messaggeri come il Ca²⁺ (Sanders et al., 1999; Knight, 2000) e le specie reattive dell'ossigeno (ROS, reactive oxigene species) (Mittler et al., 2002).

I fattori trascrizionali (TF) rappresentano l'ultimo anello della catena di trasduzione del segnale, prima dell'attivazione vera e propria di geni specifici coinvolti nella risposta allo stress. Diverse famiglie di fattori di trascrizione sono in grado di attivare i geni tipici della risposta allo stress idrico. I fattori

di trascrizione di tipo DREB2 e WRKY38, per esempio, sono stati descritti essere coinvolti nella risposta agli stress di tipo osmotico e sono in grado di regolare la trascrizione di geni inducibili da stress idrico (Sakuma et al., 2006; Marè et al., 2004). Altri TF della famiglia dei DREB inducibili da stress idrico sono CBF4/DREB1D (Haake et al., 2002), DDF1/DREB1F e DDF2/DREB1E (Sakuma et al., 2002). Inoltre, noti per essere a valle del segnale di trasduzione dell'ABA, sono i geni appartenenti alle famiglie bZip (Choi et al., 2000), MYC e MYB (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007).

Spesso i geni target di questi fattori di trascrizione sono enzimi coinvolti nella biosintesi degli osmoliti e proteine con funzione specifica nella tolleranza allo stress. L'accumulo di osmoliti determina un aumento del potenziale osmotico in modo da contrastare la perdita d'acqua dovuta a stress idrico (un processo definito aggiustamento osmotico). Effettori di questa risposta sono gli osmoliti, un piccolo gruppo di composti organici chimicamente diversi, altamente solubili, che non interferiscono con il metabolismo cellulare e che consentono alle piante di abbassare il potenziale idrico e mantenere il turgore durante condizioni di essiccamento o di salinità (prolina, sorbitolo, mannitolo, glicina-betaina, ecc.).

Una delle risposte primarie alla carenza d'acqua è la produzione di acido abscissico (ABA) che causa sia la chiusura degli stomi al fine di regolare la traspirazione fogliare, sia risposte di tipo molecolare inducendo l'espressione di geni indotti da stress (come i geni per la sintesi di osmoliti). È stato ampiamente descritto come molti geni indotti da stress idrico siano anche indotti da applicazioni esogene di ABA (Seki et al., 2002b), mentre altri siano del tutto indifferenti alla presenza di ABA esogeno, dimostrando che esistono due vie di regolazione dei geni indotti da stress idrico (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

I geni che vengono repressi o indotti in seguito allo stress idrico sono numerosi (Seki et al., 2002a). Molti di questi prodotti genici hanno un ruolo diretto nella risposta e tolleranza allo stress idrico, altri sono semplicemente coregolati. Piante modificate geneticamente allo scopo di introdurre alcuni di questi geni stress-inducibili hanno portato all'ottenimento di piante più tolleranti allo stress idrico (Zhang et al., 2004; Umezawa, 2006a; Umezawa, 2006b). Nel corso degli ultimi anni numerosi geni indotti da stress idrico sono stati identificati in *Arabidopsis*, riso, vite, mais e orzo (Cramer et al., 2007; Atienza et al., 2004) utilizzando l'approccio microarray.

Per poter agire in modo consapevole al fine di aumentare la tolleranza delle piante allo stress idrico è fondamentale identificare il maggior numero di geni indotti da stress, capire le funzioni dei singoli geni, ma soprattutto capire

le relazioni esistenti fra questi, chi sono gli effettori, e quali sono i promotori della risposta che porta alla tolleranza.

In questo lavoro è stato preso come oggetto di studio il frumento, una specie di grande interesse commerciale nell'area mediterranea, la cui produttività può essere seriamente compromessa dalla carenza idrica. Per identificare cambiamenti dei livelli di espressione genica coinvolti nella risposta allo stress idrico sono stati analizzati i profili di trascrizione di un frumento duro (Creso), uno tenero (Chinese Spring) e una sua linea di delezione, priva di una porzione del braccio lungo del cromosoma 5A recante geni di risposta agli stress abiotici (Cattivelli et al., 2002). A ognuno di questi tre genotipi sono stati imposti tre livelli progressivi di stress idrico.

MATERIALI E METODI

Materiali genetici e condizioni di crescita

Il genotipo di frumento duro (cultivar Creso) e i due genotipi di frumento tenero (cultivar Chinese Spring (CS) e una sua linea di delezione per una porzione del braccio lungo del cromosoma 5A, Chinese Spring-5AL) sono stati fatti crescere in celle climatiche a temperatura, umidità, luce e fotoperiodo controllati. Le sementi sono state poste in vaso in un terreno misto di terra, sabbia e torba (6:3:1) e le condizioni di crescita erano le seguenti: a 10°C di giorno, 7°C la notte, umidità relativa del 60%, 12 ore di luce, densità della luce 500 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fino allo spuntare della terza foglia; 22°C di giorno, 18°C la notte, umidità relativa del 55%, 16 ore di luce, densità della

GENOTIPO	TRATTAMENTO	Ψ_w (MPa)	SWC	DURATA STRESS
Creso	CTRL	14±0,58	28%	
	MS	26±1,73	18%	4 days
	SS	39±1,15	12.5%	4 days
CS	CTRL	12±0,58	28%	
	MS	22±0,58	18%	6 days
	SS	33±0,58	12.5%	6 days
CS-5AL	CTRL	11±0,58	28%	
	MS	21±1,15	18%	6 days
	SS	34±1,73	12.5%	6 days

Tab. 1 Nella tabella sono riassunte le condizioni di stress imposte ai singoli campioni, il valore del potenziale idrico di riferimento per definire lo stress moderato o intenso e, ultima colonna, i giorni necessari per il raggiungimento di quel potenziale osmotico nelle relative condizioni di SWC

luce 500 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dallo stadio di terza foglia fino a tre giorni dopo l'antesi. In queste condizioni sono stati necessari circa due mesi per raggiungere lo stadio di antesi.

Disegno sperimentale

Il contenuto idrico del terreno (Soil Water Content SWC) è stato attentamente mantenuto vicino alle condizioni di campo (SWC=28%) finché le piante non hanno raggiunto la fase di antesi. Le piante sono state monitorate mediante misurazione del potenziale idrico con una camera a pressione (PMS Instrument Co., Corvallis, OR, USA).

Il contenuto idrico del terreno è stato imposto a partire dallo stadio di antesi. Le condizioni del controllo (CTRL) sono state mantenute costanti, mentre per quanto riguarda il terreno delle piante stressate si è apportata una riduzione del SWC fino al 18% (per lo stress moderato, MS) e fino al 12,5% per lo stress intenso (SS). Le condizioni di stress sono state prolungate per il tempo necessario affinché la pianta raggiungesse nella foglia bandiera un potenziale idrico pari a 2.1/2.6 Mpa e 3.3/3.9 Mpa rispettivamente nello stress moderato e nello stress intenso. Per ognuna di queste condizioni sono state eseguite tre repliche biologiche, per un totale di 27 campioni.

Obiettivo di questo lavoro era il monitoraggio dell'espressione genica in condizioni di stress idrico durante la fase di riempimento delle cariossidi. A tal scopo sono stati prelevati campioni di glume e glumelle, tessuti che rimangono verdi e fotosintetizzanti anche durante le ultime fasi di crescita delle piante di frumento.

Estrazione dell'RNA e ibridazione dei GeneChip® Wheat Genome Array

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti di rivestimento delle spighe, glume e glumelle. Il protocollo utilizzato è lo stesso pubblicato sul sito web dedicato ai progetti dell'Arabidopsis Functional genomics Consortium (<https://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>), derivato dalla modifica del protocollo sviluppato da Chomczynski e Sacchi (1987). L'RNA totale ottenuto è stato successivamente purificato utilizzando le colonnine RNeasy seguendo raccomandazioni e protocollo descritto nel Qiagen RNeasy Mini Handbook, Aprile 2006, pp. 56-57 (Qiagen Inc., Valencia, CA). La qualità e la quantità dell'RNA estratto sono

state misurate eseguendo diluzioni seriali dei campioni ottenuti e analizzandole con lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100 con il nano kit Agilent RNA 6000 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

L'RNA di alta qualità è stato quindi processato seguendo le istruzioni raccomandate da Affymetrix (Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). In breve: si sintetizza il primo filamento di cDNA e successivamente anche il complementare sfruttando i polyA-RNA presenti nell'RNA totale (5 µg di RNA totale vengono utilizzati come materiale di partenza) utilizzando i reagenti contenuti nel kit Affymetrix One-Cycle labeling kit and Control reagents. In questa fase vengono aggiunti i controlli di RNA messaggero batterico che serviranno per appurare l'efficienza di sintesi del cRNA. Il ds-DNA così ottenuto viene purificato dai residui enzimatici delle reazioni precedenti e utilizzato come stampo per generare il cRNA marcato con biotina. I reagenti impiegati in queste reazioni sono contenuti nel Affymetrix GeneChip IVT Labeling kit.

L'incubazione dei microarray con cRNA biotinilato e la lettura allo scanner sono state effettuate presso i laboratori del dipartimento di Biochimica Molecolare dell'Università di Modena e Reggio Emilia procedendo nel seguente modo: 15 µg di cRNA biotinilato sono stati frammentati in segmenti lunghi 35-200 bp circa e ibridati sugli array secondo un processo che prevede l'incubazione degli array in un rotore a 45°C per 16 ore (Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 640). Dopo le 16 ore i GeneChip® Wheat Genome Array vengono lavati dai residui di cRNA non ibridato e dai cRNA che non hanno un'ibridazione forte (e quindi aspecifici). I cRNA biotinilati fissati al microarray vengono coniugati con la streptavidina che porta un colorante (ficoeritrina) in grado di essere letto da uno scanner. Questi ultimi due passaggi sono stati eseguiti attraverso l'utilizzo di una stazione fluidica (Affymetrix Fluidics Station 450). La lettura dei microarray è stata condotta con il GeneChip Scanner 3000.

Analisi e processing dei dati microarray

Per assicurare la qualità delle ibridazioni effettuate sono state analizzate sia le immagini dei microarray che i file riassuntivi output del software GCOS, che gestisce il GeneChip Scanner 3000. Sono stati valutati anche i parametri definiti da Affymetrix come fondamentali per testare la qualità delle ibridazioni: le performance degli OligoB2, la media dei background, i controlli

sulla sintesi del cRNA, i controlli sull'ibridazione e i controlli sui geni housekeeping.

I dati grezzi sono stati normalizzati primariamente con algoritmo RMA (Irizarry et al., 2003) utilizzando il software R (<http://www.R-project.org>) e la libreria "affy" (Irizarry et al., 2006; Gautier et al., 2004). La stessa libreria è stata utilizzata per eseguire l'algoritmo di normalizzazione, calcolo del segnale e delle "detection call" MAS 5.0 (Affymetrix, 2001). Le detection call ottenute (Present, Absent o Marginal) sono state utilizzate per applicare un filtro preliminare ai probe set da analizzare, poiché i probe set dichiarati Absent in questo algoritmo sono definiti come non analizzabili e quindi costituiscono rumore di fondo nell'analisi dei dati. Il principio applicato per rimuovere tali probe set è stato quello di dichiarare Present solo quei probe set che presentano almeno tre call Present in tutte e tre le repliche di un campione.

Utilizzando i dati in scala logaritmica (in base 2) derivati dalla normalizzazione RMA sono stati calcolati i coefficienti di correlazione lineare R^2 per ciascuna coppia possibile fra le tre repliche biologiche dei nove campioni.

I dati normalizzati RMA sono stati importati nell'ambiente di lavoro GeneSpring GX 7.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e tutte le analisi successive di processamento dei dati sono state condotte con questo software.

Sono stati eseguiti tre confronti per ognuno dei tre genotipi presi in considerazione in questo esperimento: CTRL ∇ MS, CTRL ∇ SS and MS ∇ SS.

Per identificare geni differenzialmente espressi, sono stati applicati due indici di significatività: uno statistico e uno biologico (Chen et al., 2007). Statisticamente i dati sono stati analizzati per mezzo di un Welch t-test con correzione di Benjamini e Hochberg del False Discovery Rate per i test multipli (Benjamini and Hochberg 1995). Sono stati considerati statisticamente rilevanti probe set che hanno mostrato valori di p-value inferiori a 0.05. Dal punto di vista della significatività biologica sono stati considerati differenzialmente espressi solo i probe set con livelli di espressione due volte maggiori o inferiori rispetto al confronto.

Nel disegno sperimentale di questo lavoro vi sono due variabili principali: il genotipo e il grado di stress idrico. Per identificare le componenti effettive che hanno determinato la varianza fra i campioni in esame è stata condotta una Principal Component Analysis (PCA, Yeung e Ruzzo 2001).

Successivamente è stata eseguita una analisi QT-clustering (Heyer et al., 1999) allo scopo di raggruppare geni con andamenti d'espressione simili. Il QT (Quality Threshold) clustering è un algoritmo che raggruppa i geni in base a due parametri: il numero minimo di geni necessari per determinare un

cluster e la correlazione minima che deve sussistere tra elementi dello stesso cluster. In questo lavoro è stata impostata una dimensiona minima di 30 geni e una correlazione di almeno 0.75 (correlazione di Pearson).

Una volta ottenuti i cluster, per determinare se certe categorie funzionali fossero maggiormente rappresentate in un cluster rispetto alla frequenza osservata nell'intero genoma, è stata sfruttata l'informazione disponibile nel "MIPS Arabidopsis thaliana Database" (MAtdB) (mips.gsf.de/projects/funcat) e lo strumento "Search for Functional Distribution of Gene Lists" (Ruepp et al., 2004). MIPS FunCat è un database gerarchico che mette in relazione i locus identifier di Arabidopsis con la relativa categoria funzionale. MIPS FunCat contiene 28 categorie funzionali principali suddivise in 1289 sottocategorie. Come soglia di significatività, nel considerare una categoria sovra-rappresentata rispetto la sua normale distribuzione nel genoma, si è considerato un p-value inferiore a 0.005.

Sulle sequenze rappresentate dai probe set del GeneChip* Wheat Genome Array è stata condotta un'analisi BLAST con il software HarvEST: Affymetrix Wheat1 Chip 1.50 (<http://www.harvest.unc.edu>) al fine di annotare i probe set sulla base dell'omologia di sequenza. Per determinare una soglia di significatività è stata presa in considerazione l'E-score dell'analisi BLAST. Similarità di sequenze con E-score maggiori di 10^{-10} non sono stati considerati idonei.

qRT-PCR per la validazione dei dati microarray

Per validare i dati microarray sono stati selezionati 21 geni dell'array (tab. 3) in base alla funzione genica (appartenenza a pathway biosintetici coinvolti nello stress idrico) e al livello di espressione (appartenenza a cluster di interesse). È stata condotta una quantificazione dei livelli di trascritto tramite real-time PCR.

La trascrizione inversa per sintetizzare il cDNA da utilizzare nelle reazioni di quantificazione in qRT-PCR è stata eseguita utilizzando il protocollo standard e i reagenti del kit Super ScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen). 4 µg di RNA totale, i dNTP e i primer oligo (dT)₁₈ sono stati incubati a 65°C per 5 minuti. A questa mix di reazione sono stati aggiunti il Super ScriptTM II RT Reaction Buffer e il DTT e il tutto incubato a 42°C per 2 minuti. Dopo l'aggiunta della Super ScriptTM II Reverse Transcriptase si incuba nuovamente a 42°C per 50 minuti e successivamente si riscalda a 70°C per 15 minuti allo scopo di inattivare la trascrittasi inversa.

Il cDNA ottenuto è stato quantificato utilizzando il Fluorometro Qubit™ (Invitrogen), diluito, portato a concentrazioni uguali tra i campioni e utilizzato per le reazioni di qRT-PCR.

La qRT-PCR è stata eseguita sfruttando la tecnologia SYBR Green e utilizzando il termociclatore per real-time PCR ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). La reazione di qRT-PCR è stata condotta su 1 ng di cDNA, 10 µl di SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e primer alla concentrazione di 400nM, il tutto in un volume di 25 µl. Le condizioni di PCR utilizzate sono state: 95°C per 10 minuti, 40 cicli di 95°C per 15 secondi e 60°C per un minuto.

Alla fine della reazione di amplificazione è stata eseguita una analisi per identificare le curve di dissociazione degli amplificati. La normalizzazione è stata condotta con il *reference* gene selezionato secondo i criteri descritti in seguito.

La quantificazione dei risultati ottenuti tramite qRT-PCR è stata determinata con il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$. Questo metodo confronta i valori di C_t del gene di interesse (target) nel campione da esaminare con quelli di un calibratore. I due valori di C_t sono normalizzati secondo i valori di un gene endogeno (reference gene) e paragonati a quelli del calibratore. Tale metodo è noto come metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, dove:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta C_t &= \Delta C_{t_{\text{trattamento}}} - \Delta C_{t_{\text{calibratore}}}; \\ \Delta C_{t_{\text{campione}}} &= (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{reference gene}}})_{\text{trattamento}}; \\ \Delta C_{t_{\text{calibratore}}} &= (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{reference gene}}})_{\text{calibratore}}\end{aligned}$$

Quindi si è trovato il valore del Fold Change per ciascun gene analizzato: $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

I dati dei C_t sono espressi come medie di tre repliche sperimentali. Successivamente il *fold change* del dato qRT-PCR è stato comparato con il *fold change* del dato Array, che si ottiene dividendo il valore del dato array di un campione (trattato) per il valore del suo calibratore (controllo).

Selezione di reference gene per analisi qRT-PCR

I geni che hanno un livello di espressione costitutivo (cioè mostrano sempre lo stesso livello di espressione al variare delle condizione e dello stadio di sviluppo) sono ideali per essere utilizzati come geni normalizzatori in una analisi di real-time PCR. Tuttavia, molti dei geni più comunemente utiliz-

zati a tale scopo nelle piante e negli animali, i così detti *housekeeping gene*, non sono sempre così costanti nel livello d'espressione (Thellin et al., 1999; Suzuki et al., 2000; Lee et al., 2001; Czechowski et al., 2005; Faccioli et al., 2007). Per capire la consistenza di espressione di un gene è necessario avere dei dati di espressione di moltissimi geni (teoricamente tutti i geni del genoma) provenienti da condizioni di crescita e tessuti differenti. L'analisi microarray si avvicina molto a queste condizioni ideali e sicuramente permette di identificare i geni che meno variano nei campioni analizzati nell'esperimento.

Per identificare dei *reference gene* con i dati array disponibili sono stati presi in considerazione solo i geni che mostravano *Present call* in tutti i campioni (27) sulla base dell'algoritmo MAS 5.0. 17134 probe set su 61290 hanno superato questo filtro (27.9%). Il valore di espressione di questi geni è stato normalizzato al valore di espressione della mediana per ogni singolo gene nelle 27 ibridazioni. La lista di geni è stata ulteriormente filtrata eliminando i probe set che anche in una sola ibridazione mostravano valore di espressione doppio o la metà rispetto alla sua mediana nei 27 campioni. 4768 hanno superato anche questo filtro. Successivamente, sulla base del coefficiente di variazione $CV = SD/MV$ (Deviazione standard / valore di espressione medio) si è ottenuta una lista dei geni che mostrano un minore livello di variazione. I tre probe set migliori, anche in base al livello d'espressione assoluto, che codificano rispettivamente per un fattore di iniziazione della trascrizione TIF (Ta.9068.1.S1_at $CV=0.052$), una spastina (Ta4093.1.S1_at, $CV=0.055$) e una poliubiquitina (Ta.24299.1.S1_at, $CV=0.062$) sono stati testati in qRT-PCR per stabilire quale fosse il gene effettivamente più idoneo alla funzione di reference gene. In seguito a queste analisi la poliubiquitina si è dimostrata essere la più stabile ed è stata utilizzata in questo lavoro come reference gene.

Mappaggio di geni sulla base del livello di espressione

In questo esperimento sono stati messi a confronto i trascrittomi di tre genotipi che hanno assetti cromosomici particolari e strettamente connessi tra loro: il CS è un frumento esaploide (AA BB DD) e possiede 7 cromosomi per ogni genoma aploide. CS-5AL è una sua linea di delezione ed è priva di una porzione del braccio lungo del cromosoma 5A.

Essendo 42 i cromosomi del frumento tenero, potremmo dire che CS-5AL presenta circa il 95% della struttura cromosomica di un normale fru-

mento esaploide. Creso, invece, frumento duro e quindi tetraploide (AA BB) ha un genoma che è un sottoinsieme di quello del frumento tenero e copre circa il 66% del genoma del frumento tenero. È razionale ipotizzare che i geni che non si esprimono nel frumento duro, ma che si esprimono nel tenero siano posizionati sul genoma D, oppure che si trovino sui genomi A o B e che siano regolati da elementi del genoma D. Per identificare geni con queste caratteristiche si è proceduto nel seguente modo.

È stato applicato un primo filtro stringente sulla base delle detection call: per superare tale filtro un probe set deve mostrare 18 Present call su tutte le 18 repliche dei campioni di frumento tenero, e allo stesso tempo mostrare 9 Absent call su tutte le 9 repliche di Creso (frumento duro). La lista di probe set ottenuti è stata nuovamente filtrata in base al livello di espressione che doveva risultare inferiore al livello di background in tutte le repliche del frumento duro, e tre volte maggiore del background in tutti i frumenti teneri.

Con lo stesso identico criterio applicato alle 9 repliche del genotipo CS-5AL e al suo wild-type CS, sono stati identificati geni putativamente posizionati sul braccio lungo del cromosoma 5A.

Una volta identificate le liste di geni con queste caratteristiche si è proceduto alla verifica della posizione genomica attraverso PCR su DNA genomico. Tali analisi sono state effettuate in collaborazione con il Centro ricerche dell'ENEA di Casaccia. In questa fase è introdotta una ulteriore varietà di frumento duro (Trinakria), per escludere che l'effetto osservato fosse varietà-specifico e non specie-specifico.

In base alle sequenze di interesse e alle loro omologie con altre sequenze di frumento, sono state disegnate coppie di primer specifiche e altre comuni alle sequenze omologhe. Quindi, mentre i primer comuni a più sequenze dovrebbero amplificare sia in frumento duro che tenero (controllo positivo), i primer specifici dovrebbero amplificare solo la sequenza individuata come espressa solo nei frumenti teneri e di conseguenza non mostrare nessuna banda in Creso e Trinakria.

Si sono testate coppie di primer per 70 geni putativamente mappati sul genoma D e 23 geni putativamente appartenenti al braccio lungo del cromosoma 5A.

Per verificare se l'ipotesi nulla è compatibile con i dati ottenuti, cioè che il gene selezionato appartenga al genoma D o al braccio lungo del cromosoma 5A per cause probabilistiche (circa il 33% dei geni di frumento tenero è sul genoma D e circa il 5% è sulla parte deleta del braccio lungo del 5A), è stato eseguito un test chi quadrato.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi dei parametri di qualità dell'ibridazione

La qualità delle immagini ottenute dalle 27 ibridazioni è stata messa in evidenza usando i controlli oligoB2. Tutti hanno mostrato le strutture a scacchiera attese agli angoli degli array e nessuna immagine aberrante è stata evidenziata.

Sono stati effettuati anche i controlli sui geni PolyA di origine batterica (*lys, phe, thr, dap*) e sui controlli di ibridazione (*BioB, BioC, BioD and Cre*). Tutti hanno mostrato valori compresi nei parametri forniti da Affymetrix.

Il valore medio di background osservato è stato di 39.96, ampiamente nei parametri definiti dal produttore dei microarray.

Le percentuali delle "Present call" osservata oscillava tra il 42.35% e il 51.78% dei 61mila probe set dell'array. Si è osservato, inoltre che la percentuale delle "Present call" nei genotipi di frumento duro era costantemente inferiore rispetto a quella dei frumenti teneri di almeno il 7%. Questo può essere spiegato sulla base dell'algoritmo che porta alle detection call. Infatti se un gene non è espresso nel campione di interesse il segnale sul PM probe cell sarà simile a quello del background che sarà simile a quello del MM probe cell. Di conseguenza l'algoritmo MAS 5.0 definirà tale probe set come "Absent" probe set. Visto che i frumenti duri hanno un genoma in meno rispetto ai frumenti teneri è razionale pensare che anche il numero di geni che si esprimono in una cellula sia inferiore. Il 7% di differenza costante nelle "detection call" corrisponde a circa 4200 trascritti di differenza presenti nei frumenti teneri e assenti nei frumenti duri.

L'analisi preliminare dei dati e il confronto dei parametri di qualità hanno evidenziato l'ottima qualità delle ibridazioni effettuate.

Qualità delle repliche biologiche

Per determinare la qualità delle repliche biologiche sono stati calcolati i coefficienti di correlazione lineare R^2 sui valori di espressione in scala logaritmica normalizzati con algoritmo RMA. Tutti i coefficienti oscillano tra il valore 0.93 e 0.99 indicando un alto livello di correlazione fra repliche.

L'analisi delle componenti principali della varianza ha messo in evidenza quattro componenti principali che nella totalità spiegano il 75.43% della variazione osservata nelle 27 ibridazioni (fig. 1). In particolare la componente

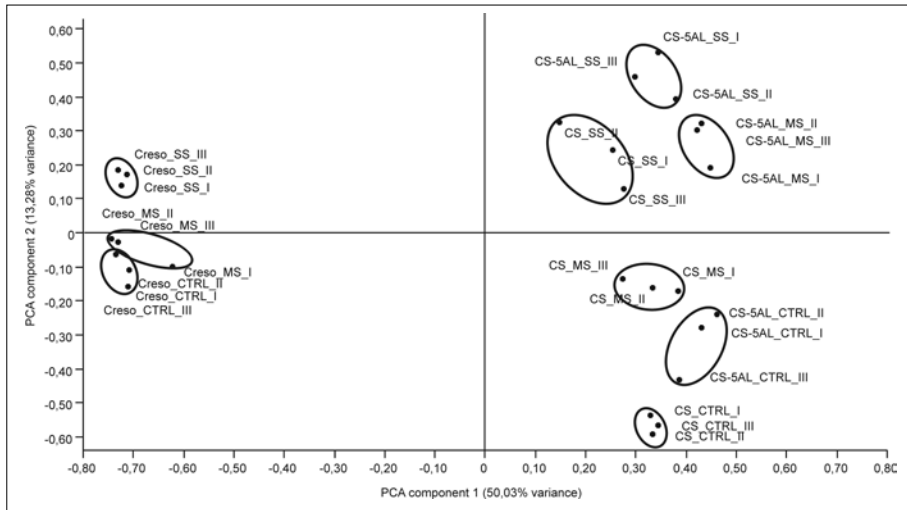


Fig. 1 Scatter plot delle repliche biologiche dei campioni in funzione delle due componenti principali della varianza ottenute in seguito a PCA. Gli ovali rappresentano i raggruppamenti in base alla replica biologica

primaria spiega ben il 50% della varianza. Ponendo su di un grafico cartesiano tale componente sull'asse x, si osserva che i campioni si separano in base alla specie a cui appartengono. I frumenti teneri si dispongono tutti alla destra del grafico, sulla sinistra i frumenti duri. Si deduce che la componente primaria corrisponde alla specie botanica di appartenenza, anche perché il CS e la sua linea di delezione non si separano sulla base di questa componente. Questo dato, ampiamente atteso, conferma che i dati microarray sono di buona qualità.

Un'altra evidenza sulla bontà dei dati ottenuti deriva dall'osservazione che le tre repliche per ciascun campione vengono raggruppate insieme nel grafico funzione delle due componenti principali, come è possibile osservare in figura 1 dove gli ovali racchiudono repliche dello stesso campione.

La componente secondaria, rappresentata dall'asse y (fig. 1) corrisponde alla variabile stress idrico. Infatti sull'asse y si separano i campioni sulla base dello stress imposto. In basso si ritrovano i campioni CTRL, in posizione intermedia i MS e in alto i SS relativi allo stesso genotipo. Da notare come la distanza tra CTRL e MS in Creso sia molto ridotta, suggerendo che dal punto di vista del trascrittoma non ci sono grosse differenze tra questi due campioni. Situazione opposta in CS-5AL dove i campioni dello stress intenso e moderato sono molto più vicini rispetto a quelli del controllo.

Confronto dei profili trascrizionali

Per identificare geni differenzialmente espressi fra i differenti genotipi o fra campioni sottoposti a crescenti livelli di stress idrico, i dati di espressione sono stati analizzati per mezzo di un Welch t-test con correzione di Benjamini e Hochberg per i test multipli (Benjamini and Hochberg, 1995). I geni identificati come differenzialmente espressi sono stati successivamente filtrati in base a un 2-fold change come parametro di significatività biologica (Chen et al., 2007), come descritto nel paragrafo sui materiali e metodi.

Come riportato in tabella 2, sono stati eseguiti nove confronti e sono stati identificati 3056 (non ridondanti) probe set differenzialmente espressi in almeno un confronto fra i diversi livelli di stress. Tre ulteriori confronti sono stati effettuati tra i tre genotipi nelle condizioni di controllo. Ben 8552 probe set sono risultati differenzialmente espressi di cui solo 607 nel confronto tra CS e la sua linea di delezione. Questi numeri testimoniano le differenze in termini di trascrittoma tra le due specie e tra CS e Cs-5AL, differenze attribuibili in larga parte alla diversa costituzione genomica (tab. 2). Il numero di geni con livello di espressione maggiore in CS rispetto a Creso è sensibilmente maggiore (circa 1300 probe set) rispetto a quelli che mostrano livello di espressione inferiore.

CONFRONTI	PROBESETS 2X UP-REGULATED	PROBESETS 2X DOWN-REGULATED	TOTALE DEI PROBE SET DIF- FERENZIALMENTE ESPRESSI
Creso			
MS Vs CTRL	0	0	0
SS Vs MS	191	302	493
SS Vs CTRL	661	809	1470
CS			
MS Vs CTRL	54	52	106
SS Vs MS	29	0	29
SS Vs CTRL	579	263	842
CS-5AL			
MS Vs CTRL	287	106	393
SS Vs MS	47	0	47
SS Vs CTRL	660	527	1187
CTRL			
CS Vs Creso	3974	2662	6636
CS-5AL Vs Creso	3889	3062	6951
CS-5AL Vs CS	226	381	607

Tab. 2 *Riassunto dei confronti eseguiti. Sono riportati il numero di geni che mostrano livelli di espressione 2 volte maggiori o minori rispetto al confronto*

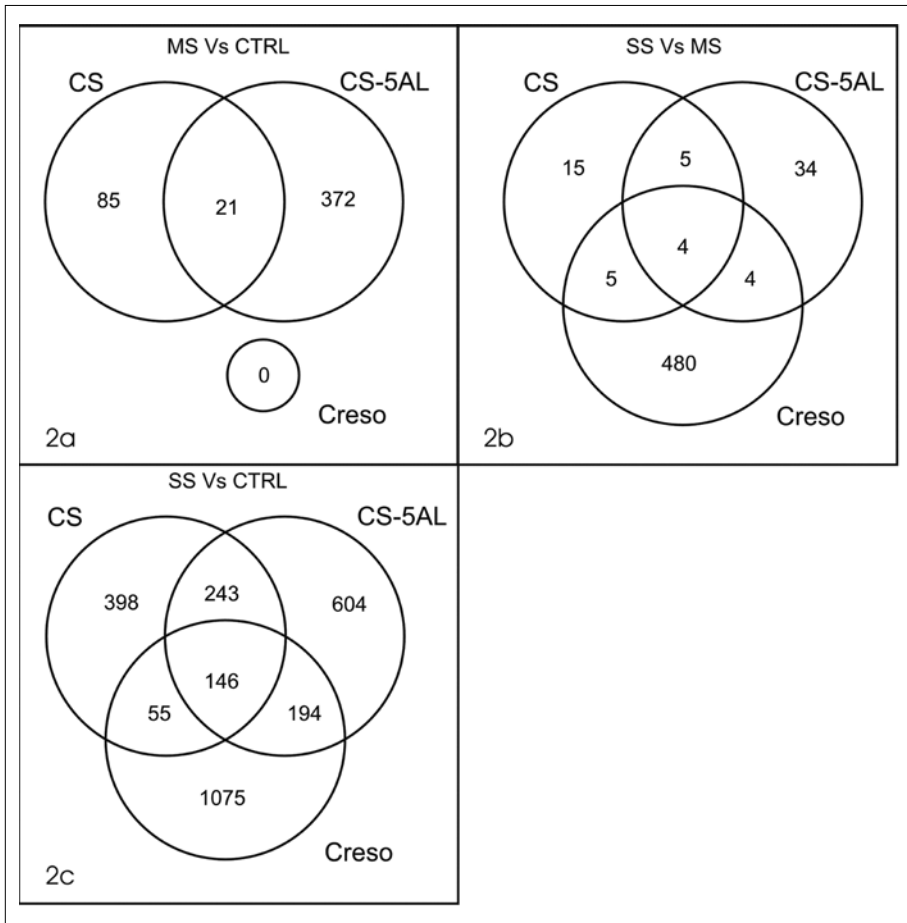


Fig. 2 Diagramma di Venn sulle liste di geni differenzialmente espressi nei confronti fra i diversi stress imposti. 2a) Stress moderato (MS) contro controllo (CTRL). 2b) Stress intenso (SS) contro moderato. 2c) Stress intenso contro controllo

Lo stress moderato comporta l'induzione dell'espressione di 106 probe set in CS e 393 in CS-5AL, mentre in Creso non si osservano differenze tra il controllo e lo stress moderato. Questo dato era già stato intuito dall'analisi delle componenti principali (fig. 1) e sottolinea come Creso necessiti di stress idrici maggiori per attivare meccanismi di regolazione dell'espressione genica rispetto al frumento tenero. Tale fenomeno può essere interpretato in due maniere differenti: a) Creso non attiva risposte trascrizionali perché lo stress subito non è tale da creare danni alla pianta; b) La risposta di Creso è tardiva rispetto a quella del frumento tenero.

Situazione opposta si verifica quando il trascrittoma in condizioni di stress moderato viene confrontato con quello in condizioni di stress severo. I frumenti teneri mostrano solo 29, in CS, e 47, in CS-5AL, geni differenzialmente espressi, mentre in Creso si osserva la differente espressione di 493 probe set (tab. 2).

I confronti fra lo stress intenso e il controllo mostrano un ampio numero di geni differenzialmente espressi, più in Creso (1470) che in CS (842).

Per identificare geni che si attivano o reprimono in seguito a carenza d'acqua in tutti e tre i genotipi, in uno solo di essi, o fra le diverse combinazioni sono stati prodotti dei diagrammi di Venn (fig. 2). In tutte e tre le rappresentazioni, corrispondenti ai tre confronti possibili, sono stati identificati pochissimi probe set comuni fra i tre genotipi. Solo 21 su 478 sono comuni fra CS e CS-5AL nel confronto tra stress moderato e controllo (fig. 2a).

Solo 4 su 547 nel confronto tra stress intenso e moderato (fig. 2b). 146 su 2715 nel confronto tra stress intenso e controllo. Mentre i dati relativi ai primi due confronti non sono molto informativi, causa il ridotto numero di geni provenienti ora da Creso (MS Vs CTRL), ora dai frumenti teneri (SS Vs MS), risulta molto sorprendente il dato proveniente dall'ultimo confronto. Solo il 5% dei geni totali che vengono attivati o repressi nella transizione dal controllo allo stress intenso risultano in comune a tutti i genotipi.

Data mining

Complessivamente 3056 probe set sono stati identificati come differenzialmente espressi in seguito a stress idrico. Tentare di estrapolare dati significativi da un così elevato numero di geni è impresa assai difficile se non si prova a frammentare il dato in porzioni più piccole e facili da analizzare.

Il data mining è, appunto, quel processo che permette di ottenere informazioni biologicamente rilevanti da una serie di liste di geni e valori di espressione. A tal scopo si è deciso di creare dei sottogruppi di geni ("cluster") accomunati da comportamenti di espressione simile. Si è opzionato l'utilizzo di un algoritmo di clustering di tipo "unsupervised" poiché non si disponeva di alcuna indicazione preliminare sul numero di gruppi attesi. Il QT-clustering (Hayer et al., 1999) permette di generare n gruppi di geni sulla base di due parametri soglia definiti dall'utente. I parametri definibili

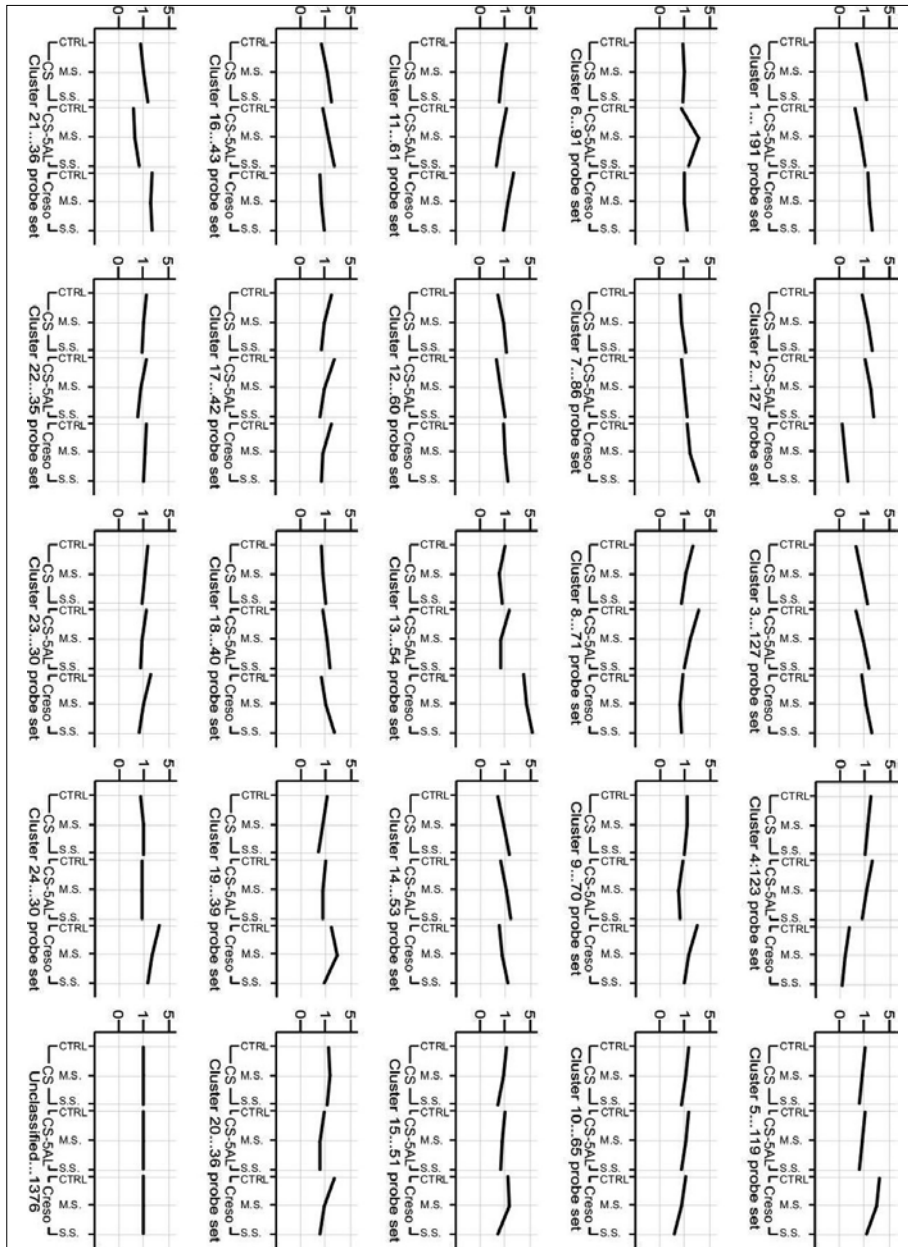


Fig. 3 Rappresentazione dei 24 cluster ottenuti con algoritmo QT-clustering. Sull'asse x sono rappresentati i tre genotipi, che raggruppano i relativi CTRL, MS e SS. Sull'asse y sono rappresentati i valori di espressione inteso come rapporto tra il valore d'espressione del gene e la mediana su tutti i campioni. L'andamento del cluster è dato dal valore di espressione medio di tutti i geni costituenti il cluster

sono la correlazione minima (correlazione di Pearson) tra gli elementi del cluster e il numero minimo di elementi per generare un cluster. Diminuire la soglia di correlazione comporta l'ottenimento di un numero minore di cluster totali, ma di dimensioni maggiori; mentre il numero di geni che risulteranno non raggruppati in alcun cluster diminuisce. Tutto questo a discapito della stringenza dell'analisi: cioè anche geni con un comportamento d'espressione non perfettamente identico potranno essere raggruppati insieme. Il parametro "numero minimo di geni per cluster" evita che vengano creati cluster di dimensioni troppo piccole e quindi poco significativi nel quadro generale. Aumentare questo parametro comporta l'eliminazione di cluster con pochi geni che di conseguenza arricchiranno il gruppo dei geni non raggruppati.

Sono stati testati differenti valori dei parametri soglia: il miglior compromesso tra numero di cluster ottenuti, geni raggruppati e geni non raggruppati è stato ottenuto impostando la correlazione di Pearson a 0.75 e il numero minimo di geni a 30.

Sono stati così individuati 24 gruppi di geni, più 1376 probe set che non sono stati raggruppati in alcun cluster (fig. 3).

In base all'andamento del livello di espressione ogni singolo cluster può essere messo in relazione con una particolare risposta della pianta allo stress idrico. Vi sono, per esempio, geni che vengono attivati allo stesso modo in tutti e tre i genotipi (come il cluster 14) e che quindi rappresentano i geni della risposta comune tra frumento tenero e duro. Analizzando inoltre le classi funzionali maggiormente rappresentate in questi cluster è possibile risalire alle funzioni geniche conservate tra le due specie in risposta a stress idrico. Di seguito sono descritti i cluster ottenuti e i possibili processi biologici cui partecipano.

Geni modulati similmente nei tre genotipi

L'unico cluster che mostra un chiaro andamento di questo tipo, cioè con geni indotti allo stesso modo nei tre genotipi, è il cluster 14. Anche il cluster 3 mostra un andamento paragonabile a quello del cluster 14, tuttavia i livelli d'espressione dei geni di frumento duro sono mediamente maggiori rispetto a quelli dei frumenti teneri (fig. 4). Per semplicità tratteremo questi due cluster come un cluster unico.

I geni del cluster 10 sono anche essi modulati allo stesso modo nei tre genotipi e repressi all'aumentare dello stress idrico (fig. 5).

L'analisi delle categorie funzionali sui 180 geni di questi due cluster ha messo in evidenza particolari classi funzionali sovra-rappresentate rispetto alla

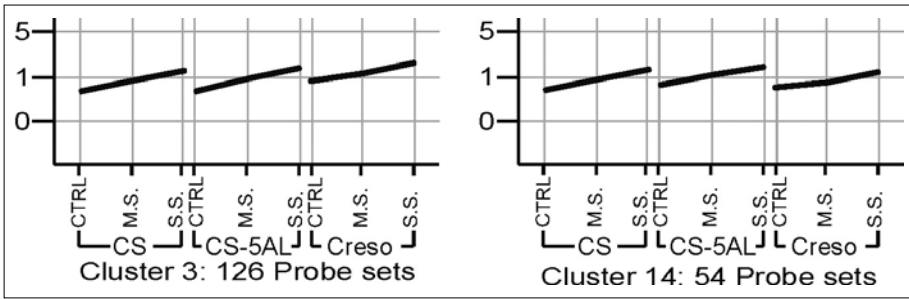


Fig. 4 Cluster 3 e 14

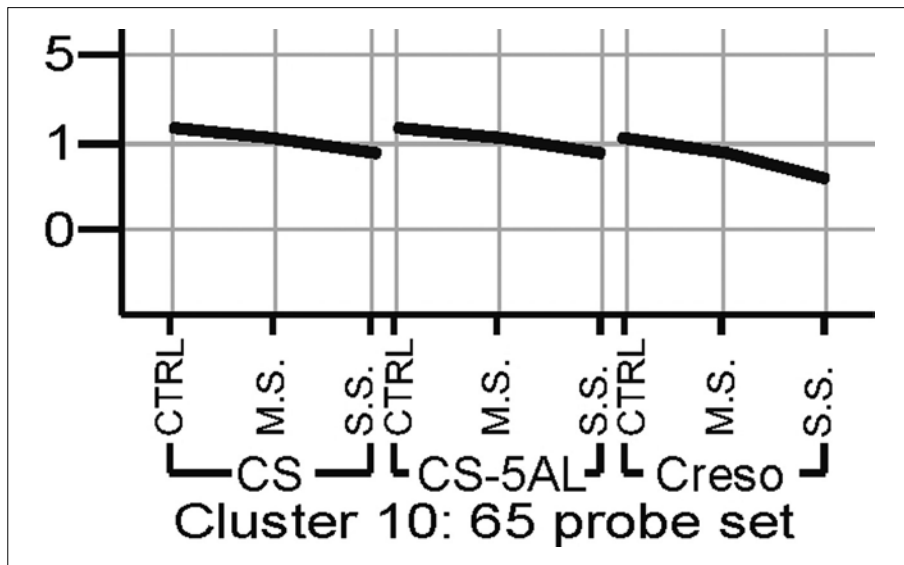


Fig. 5 Cluster 10

frequenza media osservata nel genoma. Alcune di queste classi sono coinvolte nel metabolismo primario, produzione di energia, trasporto cellulare e interazione con l'ambiente. Fra le sottocategorie di quest'ultima, vi sono la categoria "percezione e risposta allo stress idrico", "risposta all'acido abscissico" e "metabolismo della prolina".

Nello specifico appartengono a questo cluster molte delle componenti molecolari già note in letteratura per il loro ruolo nella risposta allo stress idrico: vi sono due probe set (Ta.1981.1.A1_a_at = chinasi, TaAffx.77541.1.S1_at) che rappresentano geni i cui prodotti sono delle chinasi coinvolte nella trasduzione del segnale. Vi sono, inoltre, ben quattro probe set (Ta.12813.1.S1_x_at,

Ta.12813.2.S1_x_at, TaAffx.13292.1.S1_at, TaAffx.13292.1.S1_s_at) con elevata similarità di sequenza con il gene per la NCED (9-cisepossicarotenoido diossigenasi), l'enzima chiave del pathway di biosintesi dell'ormone ABA (Seo and Koshiba 2002). Di questo enzima si parlerà nel paragrafo dedicato al pathway di sintesi dell'ABA.

Appartiene a questo cluster anche il probe set TaAffx.108538.1.S1_at codificante per il fattore di trascrizione HB-7 (homeobox-leucine zipper). L'espressione genica di HB-7, in *Arabidopsis*, è indotta da stress idrico e da trattamenti con ABA esogeno e rappresenta un fattore di trascrizione stress idrico-inducibile ABA dipendente (Soderman et al., 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). HB-7 si colloca a monte della trascrizione di RD20 (Resistant to Dehydration), una calcium binding protein che è indotta da stress idrico, salino e ABA esogeno (Takahashi et al., 2000). Un probe set (Ta.9830.2.S1_at) appartenente al cluster 3-14 ha elevata similarità con la sequenza di RD20 di *Arabidopsis*. Questi tre geni (NCED (ABA) → HB-7 → RD20) identificati nei cluster 3 e 14 hanno permesso di ricostruire in frumento una delle risposte allo stress idrico/salino ABA dipendente già descritta in *Arabidopsis*.

Altri geni codificanti fattori di trascrizione noti per il loro coinvolgimento nella risposta allo stress idrico sono stati identificati nel cluster 3-14: otto probe set di geni MYB, un WRKY, un DOF (DNA binding with One Finger) e tre probeset per fattori di trascrizione della famiglia con motivo Zinc Finger.

Infine vi sono diversi probe set con similarità di sequenza con geni effettori della risposta allo stress idrico: uno per il gene della sorbitolo deidrogenasi (Ta.21428.1.S1_x_at), enzima che catalizza la reazione che converte il glucosio-6P in sorbitolo-6P, passaggio chiave della sintesi del sorbitolo (Duanggraisai et al., 2007). Il sorbitolo è un polialcole il cui accumulo in seguito a stress idrico è stato osservato in molte piante e la sua funzione, oltre che come osmolita compatibile, sembra essere quella di difesa dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lo Bianco et al., 2000). Anche il gene chiave che porta all'accumulo di prolina a partire dal glutammato (P5CS, Δ -pirrolina 5 carbossilato sintasi = Ta.7091.1.S1_at) è stato identificato nel cluster 3-14. La sua discussione è rimandata al paragrafo appositamente dedicato al pathway della prolina.

Altri geni noti nella risposta allo stress idrico e appartenenti a questo gruppo di geni sono l'aldeide deidrogenasi (Ta.18775.1.S1_at, Ta.25596.3.A1_a_at) e la betaina-aldeide deidrogenasi (Ta.435.1.S1_at). Gli enzimi della classe delle aldeidi deidrogenasi sono state caratterizzate in uomo e sono coinvolte nella detossificazione delle aldeidi. In pianta sono state identificate diverse aldeidi deidrogenasi (ALDH) indotte da stress idrico; in particolare l'ALDH substrato specifica per la betaina-aldeide catalizza l'ossidazione verso l'osmoli-

ta compatibile glicina-betaina (Chen e Murata 2002). Una ALDH inducibile con ABA, nonché da stress idrico, è stata isolata dalla “resurrection plant” *C. plantagineum* ed è probabilmente coinvolta nella detossificazione delle aldeidi derivanti dalla perossidazione dei lipidi (Kirch et al., 2005).

Infine appartengono al cluster 3-14 anche due probe set relativi a proteine “early-responsive to dehydration” (ERD).

Il quadro complessivo che prende forma dallo studio dei cluster 3 e 14 è che questi 180 probe set, sia per il loro livello di espressione che viene indotto all’aumentare dello stress idrico, sia per il fatto che molti di loro hanno una funzione nota nella risposta allo stress idrico già descritte in altre specie, possono essere definiti come geni che costituiscono la base conservata della risposta a stress idrico in molte piante. Inoltre visto che tutti questi geni sono coregolati con l’enzima chiave della biosintesi dell’ABA è probabile che molti di loro siano a valle della produzione di questo ormone.

Tra i geni dei cluster 3 e 14 vi sono 37 probe set non ancora annotati per i quali questo lavoro fornisce una prima importante annotazione funzionale,

Il cluster 10, invece, mostra lo stesso andamento nei tre genotipi, ma il livello d’espressione diminuisce all’aumentare dello stress (fig. 5). Nessuna categoria funzionale è sovra rappresentata in questo cluster. Anche l’indagine sui singoli trascritti del cluster 10 non ha messo in evidenza geni noti nel coinvolgimento nella risposta a stress idrico, se non geni per la sintesi di proteine coinvolte in generali pathway di trasduzione del segnale (chinasi, calmoduline).

In totale i geni dei cluster che mostrano stesso andamento in risposta allo stress idrico nei tre genotipi sono 245, su un totale di 3056 geni modulati. Quindi circa l’8% dei geni che si attivano in almeno un confronto mostrano lo stesso andamento nei tre genotipi. Questo dato, evidenziato anche con l’uso dei diagrammi di Venn, sottolinea che i meccanismi messi in atto da frumento tenero e duro sono, in termini di sequenze indotte, molto differenti tra loro.

Molti dei geni osservati in questi cluster sono geni tipici della risposta allo stress idrico e molti di essi sono stati descritti in specie filogeneticamente distanti come *Arabidopsis* indicando che queste risposte sono conservate dal punto di vista evolutivo.

Probe set la cui espressione è costitutivamente più elevata in Creso

Il Cluster 1 (fig. 6) è il più grande fra i 24 cluster individuati ed è composto di 191 probe set. I geni del cluster 1 presentano un andamento differente

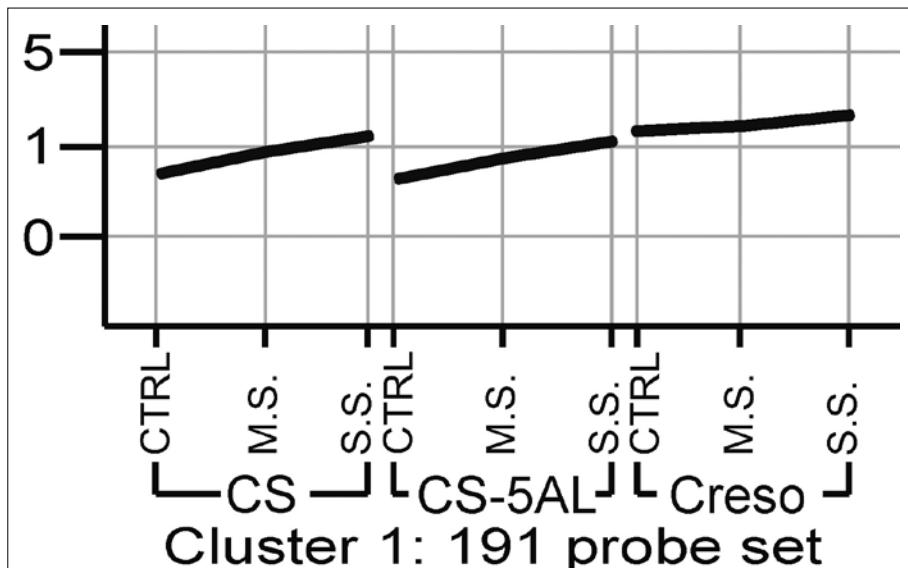


Fig. 6 Cluster 1

tra i campioni di frumento tenero e quelli di frumento duro. Essi sono infatti caratterizzati da un aumento nel livello di espressione all'aumentare dello stress idrico imposto e da un livello di espressione più elevato in Creso rispetto a CS. Inoltre nei frumenti teneri il livello d'espressione è generalmente inferiore (in particolare nei controlli), ma il livello di induzione è più elevato.

Le categorie sovra rappresentate in questo cluster riguardano il metabolismo primario e la produzione d'energia, in particolar modo i meccanismi di tipo fotosintetico.

In *Arabidopsis* è stato osservato che stress idrico e piante transgeniche per la sovra espressione di SRK2C (una proteina chinasi coinvolta nella tolleranza allo stress idrico) portano all'aumento dell'attività trascrizionale per geni codificanti proteine coinvolte nei sistemi fotosintetici, soprattutto proteine che si legano alla clorofilla (Umezawa et al., 2004). In questo cluster vi sono 24 probe set relativi a proteine cloroplastiche, di cui 16 sono annotate come "chlorophyll A-B binding protein". Il complesso che cattura la luce (LHC, Light-harvesting complex) è composto da clorofille di tipo A e B e da proteine che si legano a queste clorofille. I sistemi LHC catturano la luce e trasportano l'energia di eccitazione ai fotosistemi I e II ai quali sono strettamente associati. In seguito a cambiamenti delle condizioni di luminosità, la fosforilazione reversibile delle "chlorophyll A-B binding protein" dell'LHC

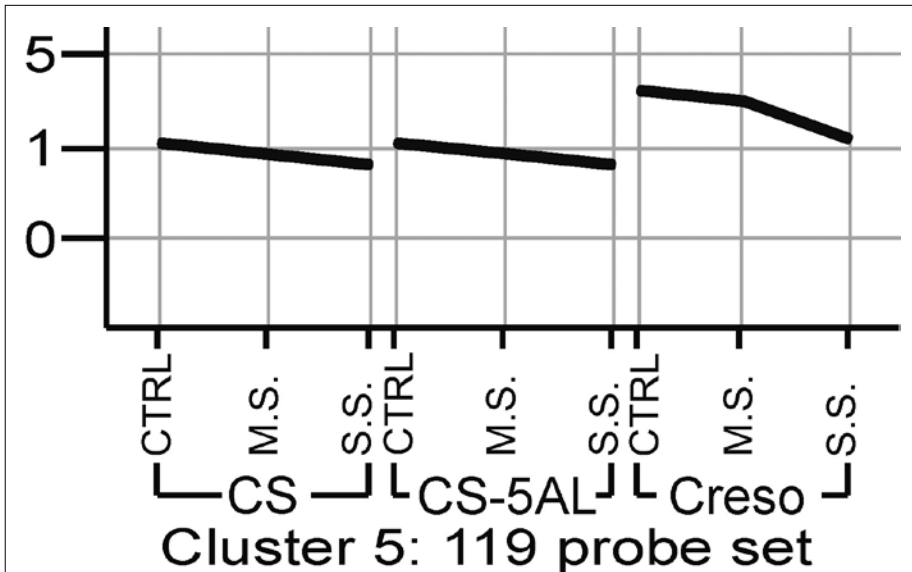


Fig. 7 Cluster 5

permette la mobilitazione del sistema antenna per il bilanciamento dell'energia fra i due fotosistemi (Liu e Shen, 2004). Un loro aumento nei livelli di espressione potrebbe essere quindi necessario per la stabilizzazione dei fotosistemi I e II che, a causa della ridotta disponibilità d'acqua, potrebbero subire delle interruzioni nel processo di accumulo dell'energia e quindi andare incontro a stress ossidativo.

Anche fattori di trascrizione di tipo MYB, bZIP e zinc finger appartengono a questo cluster. Solo quattro probe set Ta.2638.1.S1_at, Ta.29352.1.S1_at (RAB18, Responsive to ABA), Ta.28209.3.S1_at (RD22) e Ta.6973.1.A1_at (ERD, Early Responsive to Dehydration) sono noti per essere correlati con la risposta allo stress idrico. Nonostante ciò il tipo di risposta caratterizzante questo cluster, più che una risposta diretta alla carenza d'acqua, sembra essere una riorganizzazione del metabolismo dei carboidrati e della fotosintesi. Inoltre sembrerebbe che la risposta mediata dall'induzione dell'espressione di questi geni non sia necessaria nel frumento duro poiché il livello d'espressione è costitutivamente più elevato.

Anche i geni del cluster 5 risultano costitutivamente più espressi nel Creso rispetto ai frumenti teneri. In questo caso, però, il livello di espressione di Creso diminuisce all'aumentare dello stress idrico sino ad arrivare ai valori d'espressione riscontrati nei frumenti teneri nei tre trattamenti (fig. 7). In questo cluster solo categorie appartenenti al metabolismo primario sono

sopra rappresentate e anche la ricerca manuale per proteine note nel coinvolgimento nella risposta allo stress idrico non ha prodotto risultati di rilievo.

Probe set la cui espressione è costitutivamente più elevata nei frumenti teneri

Al cluster 2 e al cluster 4 appartengono quei probe set il cui livello di espressione in Creso è molto minore, quando non addirittura assente, rispetto ai frumenti teneri (fig. 8). Mentre nel cluster 2 i geni mostrano una induzione in risposta allo stress idrico, quelli del cluster 4 sono repressi.

L'analisi delle classi funzionali sul cluster 2 ha messo in evidenza che classi coinvolte nella regolazione osmotica e nella percezione dello stress idrico sono rappresentate in modo più consistente rispetto alla frequenza con cui si manifestano nel genoma intero. In questo cluster si ritrovano probe set relativi alla deidrina RAB18, a una LEA (Late Embryogenesis Abundant), una USP (Universal Stress Protein) e una "low temperature and salt responsive protein", quindi geni codificanti proteine a valle della risposta agli stress di tipo osmotico. Il probe set Ta.10389.1.S1_at codifica per una aldoso reductasi. Questo enzima in orzo è putativamente coinvolto nella conversione del glucosio in sorbitolo (pathway già incontrato nei cluster 3 e 14) e nella detossificazione da aldeidi e ha una funzione attiva nella tolleranza allo stress idrico (Roncarati et al., 1995). Questo probe set, espresso solo in frumento tenero e non in Creso potrebbe essere regolato da elementi del genoma D. Se anche l'attività enzimatica fosse confermata essere presente solo nei frumenti teneri, si potrebbe concludere che la risposta a stress idrico ottenuta attraverso l'accumulo di sorbitolo ha due vie preferenziali nei frumenti teneri.

Restando nella categoria produzione di soluti compatibili, in questo cluster è presente il probe set TaAffx.3441.1.S1_at che ha un'alta similarità di sequenza

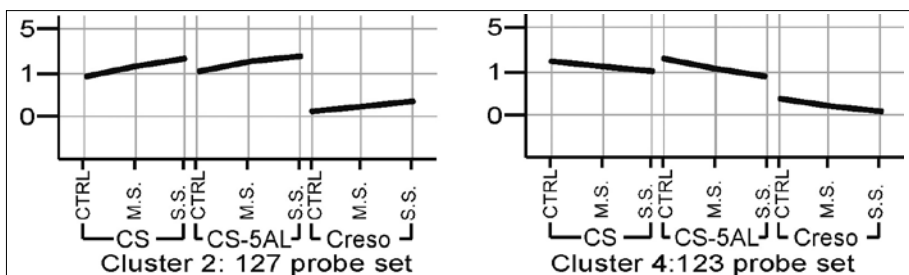


Fig. 8 Cluster 2 e cluster 4

con il gene batterico per l'ornitina ciclodeaminasi, enzima non ancora caratterizzato nelle piante. Questo enzima catalizza la produzione di prolina utilizzando l'aminoacido ornitina come precursore (Trovato et al., 2001). Si rimanda al paragrafo dedicato alla sintesi della prolina per la discussione di questo risultato.

Relativamente ai fattori di trascrizione, un probe set codificante per una proteina della famiglia MYB è presente in questo cluster 2. Un altro TF, HBP-1b (famiglia bZIP) appartiene al cluster 2. Questo fattore di trascrizione agisce legandosi ai promotori dei geni codificanti istoni (Tabata et al., 1991) ed è coinvolto nella trascrizione di geni indotti dal trattamento con acido salicilico (SA, ormone prodotto nella risposta a stress biotici). Tuttavia studi in frumento hanno dimostrato che l'applicazione di SA esogeno porta alla produzione di ABA (Shakirova et al., 2003) e, in orzo, all'accumulo di osmoliti come la prolina (El-Tayeb, 2005). Siccome HBP-1b non è espresso in Creso, probabilmente non è presente sui genomi A e B. Di conseguenza un approccio di genomica funzionale volto al "knock-out" di questo gene sarebbe possibile perché non risentirebbe dei problemi dovuti alla ridondanza genica dei frumenti e potrebbe portare a identificare l'effettivo ruolo di questo TF in frumento tenero.

Infine, in questo cluster è presente il probe set Ta.485.1.A1_at con alta similarità di sequenza con un gene per la lipossigenasi (LOX) enzima coinvolto nella sintesi dell'acido jasmonico (JA). Anche se non indotto da stress idrico l'JA può indurre l'attivazione di fattori di trascrizione MYB a monte della risposta allo stress idrico (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

I geni del cluster 2 si possono definire, dato il loro livello di espressione, geni indotti da stress idrico e, in base alla funzione di molti geni appartenenti a esso, coinvolti nella risposta di tolleranza. Inoltre, questi geni sono tipici della risposta del frumento tenero, mentre in Creso vengono leggermente indotti o in molti casi non sono espressi affatto. Come detto per i cluster 3 e 14, anche in questo cluster possono essere ricercati geni non ancora descritti come coinvolti nella risposta allo stress idrico.

I geni del cluster 4 sono, di contro, geni che vengono repressi dallo stress idrico e sono coinvolti soprattutto nel trasporto cellulare e nel metabolismo primario che, probabilmente, viene rallentato e riorganizzato in seguito allo stress idrico.

Probe set con andamento caratteristico in Creso

I geni appartenenti ai cluster 15 e 19 hanno un andamento molto particolare: mentre in CS il livello di espressione diminuisce all'aumentare dello stress, in Creso il livello d'espressione aumenta o rimane costante in

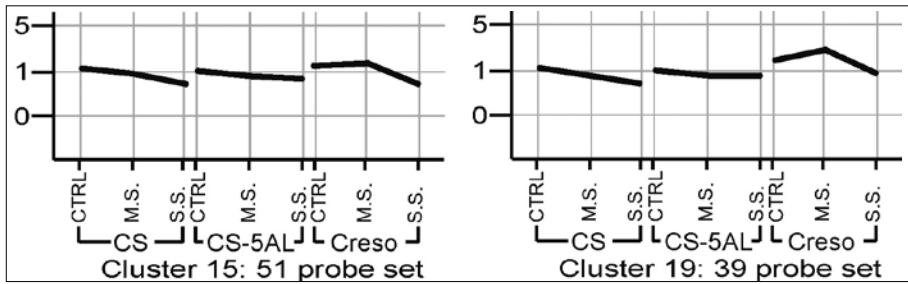


Fig. 9 Cluster 15 e cluster 19

seguito a uno stress idrico moderato, ma diminuisce rispetto al controllo se lo stress è intenso. In CS-5AL rimane pressoché uguale nei tre livelli di stress (fig. 9).

Fra le classi funzionali sopra rappresentate in questi due cluster vi sono microtubuli, elementi del citoscheletro, parete cellulare, risposta agli stress. La sintesi di elementi del citoscheletro ed enzimi per la degradazione/sintesi della parete cellulare viene di norma attivata per favorire la distensione e divisione cellulare. Una delle risposte comuni in tutte le piante è proprio il blocco della distensione e crescita in modo da ridurre le dimensioni delle superfici traspiranti.

Da questi dati si può dedurre che questo meccanismo è evidente anche nei frumenti e che mentre CS inizia a ridurre il livello di espressione di questi geni anche in seguito a uno stress moderato, Creso necessita di uno stress maggiore affinché attivi questo tipo di risposte.

Probe set con andamento caratteristico in CS-5AL

Il cluster 6 rappresenta un gruppo di geni dall'andamento estremamente anormale (fig. 10).

Il livello di espressione dei 91 geni che costituiscono il cluster è costante sia in CS che in Creso. In CS-5AL il livello d'espressione nella condizione di controllo è simile ai livelli dei controlli di CS e Creso. Nello stress moderato i livelli d'espressione aumentano notevolmente, per poi ritornare quasi ai livelli osservati nel controllo quando la pianta è sottoposta a uno stress intenso. I 91 geni di questo cluster sono quasi tutti privi di annotazione, tranne 13 che sono associati a sequenze di trasposoni e retrotrasposoni.

Esistono numerosi studi a supportare l'idea che i trasposoni e i retrotrasposoni siano elementi mobili del genoma la cui trasposizione è attivata come sistema di regolazione epigenetica all'insorgere di stress di diversa natura (biotici e abiotici) come fonte di variabilità genetica (riarrangiamento del genoma) (Rapp e Wendel, 2005). L'esempio più studiato di questo tipo di risposta è l'attività trascrizionale degli elementi *Tam* (elementi trasponibili di *Antirrhinum majus*), trasposoni della classe II sensibili alla temperatura. Coen et al. (1986) hanno caratterizzato tre elementi di petunia (*Tam1*, *Tam2* e *Tam3*), responsabili delle mutazioni del colore dei fiori. In *Medicago sativa* è stata osservata attivazione trascrizionale di copie multiple di un retrotrasposone indotta da freddo (Ivashuta et al., 2002) (Madlung e Comai, 2004). Recentemente è stato proposto che questi elementi si attivino anche in presenza di un cosiddetto "stress genetico". Stress interni come l'alloploidizzazione e l'ibridazione sono un esempio di stress genetico e causano l'attivazione di elementi trasponibili. Ad esempio Kashkush et al. (2003) hanno osservato attivazione trascrizionale di retrotrasposoni in frumento poliploide e l'attivazione di retrotrasposoni è stata individuata in ibridi di riso (Liu e Wendel, 2000). I risultati di questo lavoro potrebbero rafforzare questo tipo di ipotesi dato che sono derivati dall'analisi di una linea deleta (la delezione è da considerare uno stress genetico) in condizione di stress idrico.

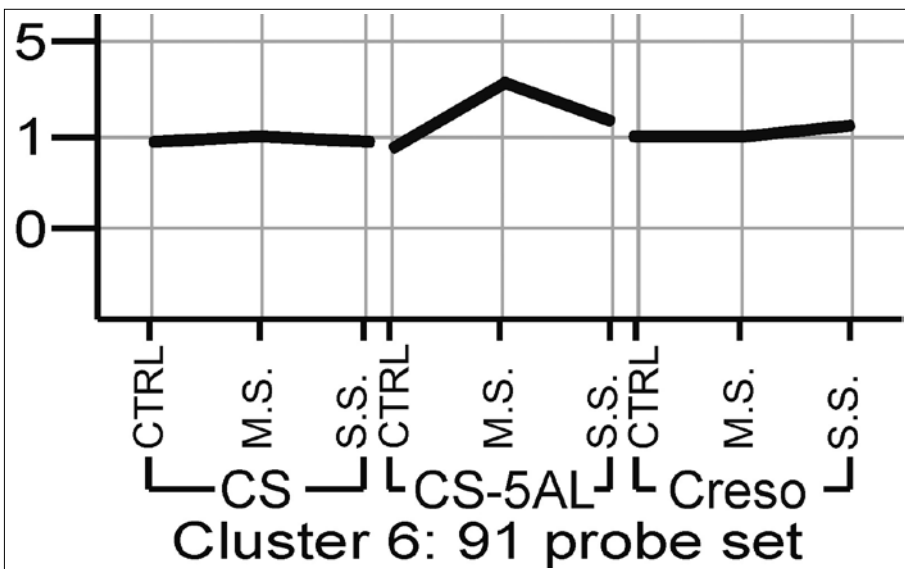


Fig. 10 Cluster 6

I risultati di questo lavoro indicano che c'è attivazione trascrizionale maggiore di questi elementi trasponibili nei campioni sottoposti a stress moderato rispetto ai campioni severamente trattati. Ciò fa supporre che un tipo di regolazione epigenetica basata sull'attivazione degli elementi trasponibili può avvenire in una fase di acclimatamento a stress abiotico.

I restanti cluster sono tutti piccole variazioni di quelli già descritti sinora.

L'analisi cluster unita alla ricerca di categorie sovra rappresentate si è rivelata essere efficace nell'identificazione di geni coinvolti nello stress idrico e ha permesso di fare luce sulle differenze fra i profili trascrizionali di frumento tenero e duro. Un'altra strategia perseguibile di data mining è la ricostruzione di pathway di interesse. Il concetto sottostante questa analisi è molto semplice e consiste nell'osservare i livelli di espressione di tutti i geni codificanti gli enzimi di una via biosintetica.

Geni codificanti per il pathway di biosintesi dell'ormone ABA

L'acido abscissico è l'ormone che regola la risposta alla carenza d'acqua nelle piante. Il pathway di biosintesi dell'ABA e la sua regolazione sono stati ampiamente descritti (Seo and Koshiba, 2002). L'utilizzo di esperimenti microarray consente di dissezionare punto per punto vie biosintetiche completamente descritte e di ricostruire l'andamento d'espressione dei geni coinvolti nelle condizioni e nei genotipi di interesse.

I passaggi iniziali del pathway coincidono con il pathway di biosintesi dei carotenoidi poiché il β -carotene è il principale precursore dell'ABA. Dato che la fitoene sintasi (PSY) è stata descritta essere il primo enzima che regola la sintesi dei carotenoidi, il controllo dei livelli d'espressione è iniziato proprio dalla PSY, per poi ripercorrere tutti i passaggi che portano alla sintesi dell'ABA.

La biosintesi dell'ABA, a partire dal geranilgeranil-PP, necessita di 10 reazioni chimiche di cui 9 catalizzate da enzimi (fig. 11).

Sul GeneChip[®]Wheat Genome Array sono stati identificati 118 probe set corrispondenti a sequenze codificanti per i 9 enzimi del pathway.

Il primo enzima del pathway è la fitoene sintasi (2.5.1.32) ed è rappresentato da tre probe set sul microarray. Uno dei tre probe set mostra livelli di espressione nulli (o comunque inferiori al livello del background medio dell'array), un altro non è differenzialmente espresso e mostra livelli d'espressione poco maggiori del valore del background, mentre il terzo (Ta.20776.1.S1_at) risulta differenzialmente espresso e il comportamento d'espressione appartiene alla tipologia descritta nel cluster 1.

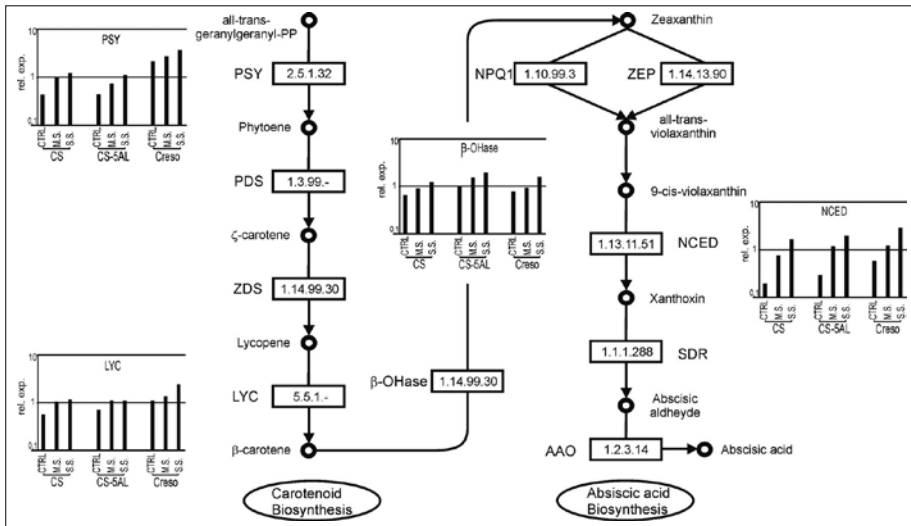


Fig. 11 Pathway di biosintesi dell'acido abscissico. Sulla sinistra la porzione di via metabolica che porta alla formazione del β -carotene. Sulla destra quella specifica per l'acido abscissico. I quattro istogrammi rappresentano i livelli di espressione dei probe set differenzialmente espressi di PSY, LYC, β -OHase e NCED. In ascissa vi sono i campioni raggruppati per genotipi e stress crescente (CTRL, MS e SS). In ordinata i valori di espressione del gene normalizzato in base al valore della mediana in tutti i campioni. Il valore 1 significa che il valore d'espressione del gene è uguale a quello della mediana su tutti i campioni. 2.5.1.32=Fitoene sintasi; 1.3.99.-=Fitoene desaturasi; 1.14.99.30= ζ -carotene desaturasi; 5.5.1.-=licopene β -ciclasi; 1.14.99.-= β -carotene idrossilasi; 1.14.13.90=Zeaxantina epossidasi; 1.13.11.51=9-cis-epossicarotenoide diossigenasi; 1.1.1.288=SDR; 1.2.3.14=AAO3

Il secondo enzima è la fitoene desaturasi (PDS, 1.14.99.-). Vi sono due probe set sul chip che hanno elevata similarità di sequenza con il gene codificante questo enzima. Uno non è espresso, mentre l'altro mostra livelli d'espressione medio-bassi (2 volte il valore del background) e costanti in tutti i campioni. Si osserva la stessa situazione anche per l'enzima ζ -carotene desaturasi (ZDS, 1.14.99.30): due probe set di cui uno non espresso e l'altro che mostra livelli d'espressione elevati ma costanti in tutti i campioni.

Lo step successivo è regolato dalla licopene β -ciclasi (LYC, 5.5.1.-). Sul microarray sono presenti tre probe set relativi al gene codificante la LYC. Due di questi hanno livelli d'espressione costanti. Uno (TaAffx.95060.1.S1_at), invece, risulta differenzialmente espresso nel confronto tra controllo e campione sottoposto a stress intenso nel genotipo Crespo. Tuttavia il livello d'espressione di quest'ultimo probe set non è molto elevato. Con questa reazione si conclude il pathway di biosintesi del β -carotene. Le reazione che

verranno discusse in seguito sono, invece, specifiche della via biosintetica dell'acido abscisico.

Il primo passaggio prevede la conversione del β -carotene a zeaxantina, una reazione catalizzata dalla β -carotene idrossilasi (β -OHase, 1.14.99.-). Su tre probe set corrispondenti a questo enzima, due mostrano livello d'espressione nullo, mentre uno (Ta.8484.1.A1_at) risulta indotto all'aumentare dello stress idrico nei tre genotipi.

La zeaxantina epossidasi (ZEP, 1.14.13.90) è rappresentata da due probe set. Uno non è espresso, mentre l'altro ha livelli di espressione medi (8 volte il background) e risulta essere indotto nei tre genotipi all'aumentare dello stress idrico. Tuttavia il livello di induzione non è così elevato da permettere, in base alla definizione riportata nei materiali e metodi, di essere considerato un gene differenzialmente espresso.

Il passaggio successivo è la scissione ossidativa della 9-cis-violaxantina in xantoxina catalizzata dall'enzima 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi (NCED, 1.13.11.51). In *Phaseolus vulgaris* è stato osservato che, in condizioni di stress idrico, il livello di mRNA per questo enzima aumenta notevolmente, così come i livelli di proteina e di ABA suggerendo il ruolo di regolazione di questo gene nella biosintesi (Qin and Zeevart 1999). Questi dati sono stati confermati anche in altre specie di interesse agrario come in avocado, pomodoro e fagiolo. Anche in *Arabidopsis* è stato osservato come l'sovra espressione di AtNCED sia indotta da stress idrico e determini l'accumulo di ABA (Iuchi et al., 2001). Sul GeneChip[®]Wheat Genome Array esistono 13 probe set associati al gene codificante la NCED. Di questi, cinque hanno livelli di espressione inferiori a quelli del background, quattro hanno livelli di espressione medio-alti ma costanti, e i restanti quattro (Ta.12813.1.S1_x_at, Ta.12813.2.S1_x_at, TaAffx.13292.1.S1_at, TaAffx.13292.1.S1_s_at) sono differenzialmente espressi e sono stati raggruppati nel cluster 3, cioè il cluster dei geni di risposta allo stress idrico.

L'enzima SDR (Short Chain Dehydrogenase/reductase) è rappresentato da un numero elevatissimo di probe set (90) e solo tre di essi risultano differenzialmente espressi. Un unico probe set rappresenta l'ultimo enzima del pathway e risulta non differenzialmente espresso.

In conclusione dallo studio dettagliato dei geni codificanti gli enzimi principali della via biosintetica per la produzione di ABA è risultato che alcuni trascritti (PSY, LYC, β -OHase, e SDR) sono blandamente indotti dalla riduzione di acqua disponibile, mentre il trascritto relativo alla NCED risulta fortemente indotte. Questi dati si allineano perfettamente a quelli riscontrati

in letteratura dove l'enzima per la NCED è descritto essere l'enzima chiave del pathway; risulta altresì evidente che la sua regolazione avviene a livello trascrizionale.

Geni codificanti per il pathway di biosintesi della prolina

La prolina è un amminoacido apolare che funziona anche come osmo-protettore nella risposta allo stress idrico nelle piante. Piante transgeniche in grado di accumulare alte concentrazioni di questo osmolita mostrano una maggiore tolleranza a condizioni di carenza idrica (Kavi Kishor et al., 1995).

Sul GeneChip[®]Wheat Genome Array sono stati identificati 28 probe set corrispondenti a sequenze codificanti per 9 enzimi coinvolti nel pathway di biosintesi e degradazione della prolina.

Nelle piante questo amminoacido è sintetizzato attraverso due vie differenti: una via ha come precursore il glutammato mentre l'altra l'ornitina (De-launey et al., 1993) ed è stato dimostrato che il pathway che ha inizio con il glutammato è catalizzato dalla P5CS (Δ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase), un enzima bifunzionale dal quale dipende la velocità di sintesi. La sua prima attività, la γ -glutammil sintasi, catalizza la fosforilazione ATP-dipendente dell'L-glutammato. Il γ -glutammil fosfato così prodotto è poi convertito a glutammico γ -semialdeide (GSA) a opera della GSA riduttasi NADPH-dipendente (Hu et al., 1992; Yoshida et al., 1995). Il primo enzima analizzato, dunque, è stata la P5CS che è rappresentata sull'array da un solo probe set (Ta.7091.1.S1_at). Questo probe set risulta indotto nella condizione di stress ed è un gene raggruppato nel cluster 3. L'enzima P5CS è, infatti, subisce un'induzione proporzionale alla severità dello stress nei tre genotipi di frumento, con l'eccezione che i livelli di espressione dei geni di frumento duro sono mediamente maggiori rispetto a quelli dei frumenti teneri (fig. 12).

Dato che in condizioni di stress osmotico P5CS svolge un ruolo chiave nella biosintesi della prolina in quanto è coinvolto nel passaggio maggiormente regolato del processo biosintetico (Kiyosue et al., 1996) possiamo pensare che le varietà di frumento utilizzate in questo lavoro attuino una risposta di aggiustamento osmotico mediato dall'accumulo di prolina come difesa allo stress idrico.

Il passaggio successivo è la ciclizzazione spontanea dell'intermedio L-glutammato-semialdeide a D-pirrolina-5-carbossilato, che è convertita a prolina a opera dell'enzima NADPH-dipendente D-pirrolina-5-carbossilato reductasi (P5C1, 1.5.1.2). Questo enzima sull'array è rappresentato da tre Probe set

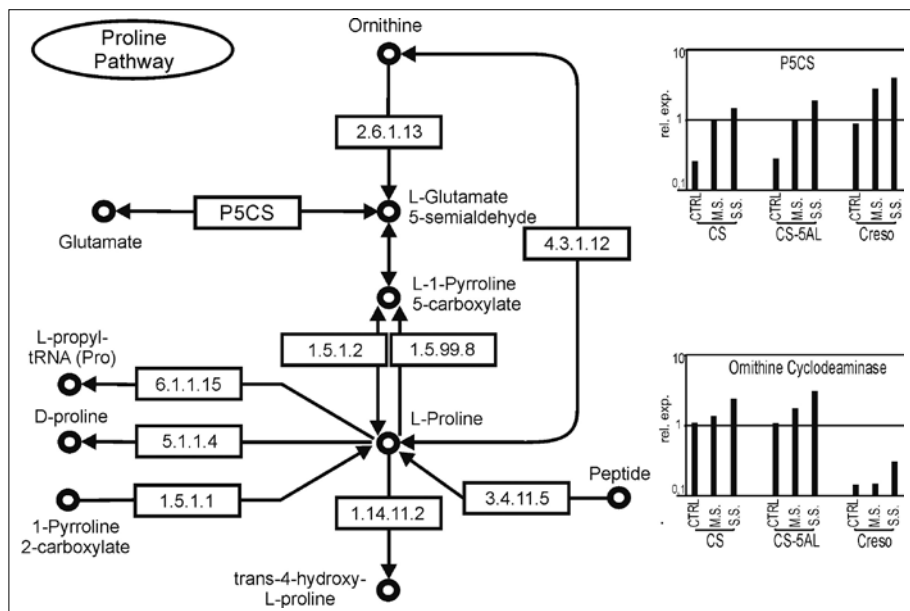


Fig. 12 Pathway di biosintesi della prolina. I due istogrammi rappresentano i livelli di espressione dei probe set differenzialmente espressi: P5CS e Ornitina ciclodeaminasi. In ascissa vi sono i campioni raggruppati per genotipi e stress crescente (CTRL, MS e SS). In ordinata i valori di espressione del gene normalizzati in base al valore della mediana in tutti i campioni. Il valore 1 significa che il valore d'espressione del gene è uguale a quello della mediana su tutti i campioni. 2.6.1.13=ornithine aminotransferase; P5CS= Δ -pyrroline-5-5carboxylate synthase; 4.3.1.12= ornithine cyclodeaminase; 1.5.1.2= Δ -pyrroline-5-5carboxylate reductase; 1.5.99.8=proline dehydrogenase; 6.1.1.15=prolyl-tRNA synthase; 5.1.1.4=proline racemase; 1.14.11.2=prolyl hidrosilase; 3.4.11.5=prolyl aminotransferase; 1.5.1.1=pyrroline-2-carboxylate reductase

nessuno dei quali è risultato differenzialmente espresso. Ciò conferma che la biosintesi della prolina è regolata a livello dell'enzima P5CS.

La seconda via di biosintesi della prolina, converte l'ornitina a L-glutammato-semialdeide con l'intervento di catalisi dell'ornitina- δ -amminotransferasi (2.6.1.13). Sul GeneChip[®]Wheat Genome Array vi sono 5 Probe sets rappresentativi per questo enzima ma nessuno di questi presenta variazioni del livello di espressione in funzione dello stress imposto. L'ornitina- δ -amminotransferasi e l'enzima della via derivata dal glutammato, pirrolina-5-carbossilato sintetasi, appaiono essere regolati in modo differente a livello trascrizionale. Da qui le due vie convergono fino alla sintesi della prolina.

La produzione della prolina a partire da ornitina può avvenire anche in un unico passaggio catalizzato dalla ornitina ciclodeaminasi (4.3.1.12) (Trovato

et al., 2001). Nei microarray per questo enzima è presente un solo probe set e il suo livello di espressione aumenta in seguito a stress idrico nei frumenti teneri, mentre in Creso il livello di espressione è nullo.

Sono stati indagati altri enzimi che catalizzano la produzione di prolina a partire da altri precursori, come la prolyl aminopeptidasi (3.4.11.5), per la quale esistono 4 Probe set sull'array e altri 5 Probe set rappresentativi per la famiglia delle aminopeptidasi ma nessuno di questi ha mostrato modulazione del livello di espressione in condizione di stress idrico o la pyrroline-2-carboxylate reductase (1.5.1.1) che, però, non presenta Probe sets sull'array.

La degradazione della prolina può avvenire in diversi modi. Uno degli enzimi coinvolti nel catabolismo di questo amminoacido è la prolina deidrogenasi (1.5.99.8), che è rappresentata sul chip da 4 Probe sets. Tra questi c'è pure la prolyl-tRNA synthase, che conta sul chip 4 Probe sets. Nessuno tra questi enzimi di degradazione della prolina risulta differenzialmente espresso. Gli enzimi proline racemase (5.1.1.4) e prolyl idrossilasi (1.14.112) non sono rappresentati da alcun Probe set sul microarray.

L'analisi della prolina deidrogenasi di *Arabidopsis* (PDH), che catalizza la conversione della prolina di nuovo a pirrolina-5-carbossilato, la prima delle reazioni degradative in lievito, suggerisce che il catabolismo giochi un ruolo importante nel determinare le concentrazioni di prolina libera nelle piante (Nanjo et al., 1999). L'mRNA della prolina deidrogenasi è regolato in modo reciproco all'enzima biosintetico pirrolina-5-carbossilato sintetasi sia durante la disidratazione/reidratazione sia durante lo stress da NaCl e il recupero. Questi risultati suggeriscono che la via degradativa è soppressa durante i periodi di sintesi *de novo*, per impedire un ciclo futile, e successivamente è attivata per riportare le concentrazioni di prolina alle condizioni precedenti lo stress. Il risultato di questo lavoro confermano questi studi, dato che, i livelli di espressione del gene della prolina deidrogenasi sono molto bassi o addirittura nulli nei tre diversi genotipi e alle diverse condizioni di idratazione.

Ciò che si può concludere da queste osservazioni è che la via biosintetica della prolina dipendente da glutammato è attiva in tutti e tre i genotipi. L'espressione genica dell'enzima regolatore della via biosintetica della prolina a partire da acido glutammico risulta indotta da stress idrico. Tuttavia, i livelli di espressione della P5CS risultano maggiori in Creso. Per contro, nei frumenti teneri è stato individuato un trascritto con alta similarità di sequenza con una ornitina ciclodeaminasi, tale trascritto risulta essere indotto da stress idrico. Mentre per la P5CS è nota la funzione in piante e la relativa regolazione di tipo trascrizionale, per l'ornitina ciclodeaminasi sono necessari ulteriori studi per verificare

l'effettiva presenza della proteina e la putativa funzione. Nel caso in cui fosse confermato il ruolo osservato nei batteri potremmo concludere che, mentre Creso produce prolina preferenzialmente a partire da glutammato, i frumenti teneri sono in grado di convertire sia glutammato che ornitina a prolina.

Validazione dei dati microarray

Per confermare che il dato ottenuto attraverso l'analisi microarray rispecchi realmente la quantità di trascritto presente nei campioni, sono stati selezionati 21 geni al fine di controllare il loro livello d'espressione con la tecnologia a oggi ritenuta la più sensibile fra quelle disponibili: la qRT-PCR.

Delle 21 coppie di primer disegnate, 15 si sono rivelate idonee per l'analisi in real time PCR dato che presentavano un solo picco nella curva di dissociazione. Di queste 15 coppie, circa il 90% hanno mostrato avere un livello di espressione simile a quello osservato tramite microarray nei 9 campioni oggetto di questo studio. Anche in altri lavori sono state riportate percentuali simili di sovrapposizioni tra dati array e dati qRT-PCR.

Anche il reference gene selezionato sfruttando i dati array si è dimostrato idoneo allo scopo.

Mappaggio di geni sulla base del livello di espressione

Sulla base della procedura descritta nei materiali e metodi, è possibile identificare geni il cui livello di espressione sia nullo in Creso o in CS-5AL e allo stesso tempo che sia medio-alto in CS. Tale approccio è il primo esempio di identificazione della posizione cromosomica di geni di frumento sulla base dell'espressione genica ottenuta da dati microarray. Per questo motivo sono stati applicati criteri molto stringenti. Si sono così identificati 197 geni putativamente collocati sul genoma D e 25 sul braccio lungo del cromosoma 5A.

Dato l'alta tasso di ridondanza genica nei frumenti sono stati necessari alcuni accorgimenti nel disegno dei primer al fine di escludere falsi positivi. A tal scopo per ogni gene candidato per una determinata regione cromosomica, sono state disegnate più coppie di primer. Una coppia di primer definita "aspecifica" poiché in grado di amplificare su tutti i geni omologhi dei tre genomi di frumento tenero. Tale coppia di primer funge da controllo positivo. Successivamente è stata disegnata almeno un'altra coppia di primer definita "specificata" dato che il loro target è esclusivamente il gene da map-

pare. Se i primer “aspecifici” amplificano la sequenza prevista in frumento tenero e duro e si osserva assenza di amplificazione da parte dei primer “specifici” in frumento duro allora il gene può essere ragionevolmente localizzato sul genoma D.

La validazione su DNA genomico ha evidenziato che circa il 50% delle 70 coppie di primer per i geni testati per putativa posizione sul genoma D, effettivamente non danno alcun prodotto di amplificazione in Creso e in Trinakria.. Dato che circa il 33% dei geni di frumento tenero sono attesi essere posizionati sul genoma D, il test del χ^2 , che permette di confrontare la percentuale attesa con quella effettiva, porta alla conclusione che l’approccio utilizzato non è significativo nell’individuazione di geni posizionati sul genoma D. In futuro si pensa di aumentare il numero di geni testati.

Stessa percentuale di conferma si è osservata per i putativi geni del braccio lungo del cromosoma 5A. Su 23 coppie di primer testate, 12 (52%) non amplificano alcun prodotto genico nel genotipo CS-5AL.

In questo caso, dove la frequenza attesa di geni appartenenti al braccio lungo del cromosoma 5A è di circa il 5%, il test del χ^2 porta alla conclusione che la strategia utilizzata permette un consistente arricchimento di liste di geni appartenenti al 5AL.

In conclusione la medesima strategia nella ricerca di geni appartenenti al genoma D o a una porzione del braccio lungo del cromosoma 5A ha portato a ottenere liste arricchite nella presenza di tali geni. Tuttavia mentre nel secondo caso la percentuale di arricchimento è molto elevata, nel caso dei geni del genoma D l’arricchimento è meno evidente. Questo fenomeno potrebbe derivare dal disegno di primer non effettivamente specifici per le sequenze di interesse. Infatti a causa della limitata conoscenza del genoma del frumento potrebbero esistere sequenze non presenti in banche dati, ma omologhe a quelle individuate. Per questo motivo le sequenze che non sono state confermate tramite PCR per essere posizionate sul genoma D non necessariamente sono collocate sul genoma A o B.

CONCLUSIONI

Il trascrittoma di CS (frumento esaploide) in condizioni di irrigazione è risultato profondamente differente da quello della varietà Creso (frumento tetraploide) mostrando oltre 6000 geni espressi in modo differente tra i due genotipi. Considerando che, mediamente, sono stati individuati circa 30mila probe set espressi, l’assenza del genoma D nel frumento duro comporta una

ampia riorganizzazione del trascrittoma attraverso la modulazione di 1/5 della totalità dei geni espressi. Questa situazione influenza anche la risposta allo stress idrico poiché pochi geni hanno mostrato avere comportamenti di espressione simili in risposta a stress idrico a causa di livelli trascrizionali di partenza considerevolmente differenti.

Nel confronto tra CS e CS-5AL in condizioni di irrigazione sono stati osservati circa 600 geni con differenti livelli di espressione causati, quindi, dalla mutazione cromosomica a carico del braccio lungo del cromosoma 5A. Tuttavia questa mutazione cromosomica non ha determinato notevoli cambiamenti nella risposta allo stress idrico tra CS e CS-5AL.

L'analisi dei profili di espressioni di frumento tenero e duro ha messo in evidenza, innanzitutto, che oltre 3000 geni differenti possono essere attivati come risposta allo stress idrico. Solo una piccola porzione è attivata o repressa comunemente dai tre genotipi studiati, mettendo in evidenza una netta differenza tra la risposta molecolare del frumento tenero da quella del duro. Tuttavia, fra i geni indotti in egual modo fra frumento tenero e duro ritroviamo geni codificanti per enzimi con ruoli chiave nella risposta allo stress idrico, come quelli coinvolti nella sintesi dell'acido abscissico, l'ormone che regola la risposta allo stress idrico nei vegetali.

Un'altra risposta molto importante che le piante mettono in atto è la produzione di osmoliti in grado di contrastare gli effetti della carenza idrica. Dall'analisi dei trascrittomi emergono alcune situazioni interessanti. Il sorbitolo, per esempio, si ottiene dalla conversione del glucosio a opera dell'enzima aldoso reductasi. Sul microarray utilizzato vi sono due interessanti probe set per questo gene e tutti hanno un differente comportamento d'espressione: uno ha un andamento comune nei tre genotipi, mentre l'altro è frumento-tenero specifico.

Situazione simile anche per un altro osmolita come la prolina. Il pathway di biosintesi di questo aminoacido ha due possibili precursori: il glutammato e l'ornitina. L'enzima chiave del pathway glutammato dipendente è la P5CS (Delta 1 Pirrolina-5-carbossilato sintasi), mentre la ornitina ciclodeaminasi catalizza la reazione da ornitina a prolina. I livelli di espressione del gene per la P5CS aumentano sia nei frumenti teneri che duri all'aumentare dello stress idrico, tuttavia il livello di espressione in Creso è molto più elevato rispetto ai frumenti teneri. Per contro il gene per l'ornitina ciclodeaminasi viene attivato solo nei frumenti teneri, mentre il livello di espressione in Creso è nullo in tutte le condizioni.

Da questi dati si può riassumere che i trascritti attivati da frumento tenero e frumento duro sono molto differenti tra loro, così come l'intero profilo

d'espressione. Tuttavia le risposte che vengono attivate sono spesso identiche anche se vengono ottenute attraverso l'induzione di geni differenti.

Un altro punto critico che si può evidenziare nell'analisi dei profili d'espressione è che Creso necessita di uno stress maggiore affinché attivi una risposta di tipo trascrizionale. Infatti mentre CS, nella transizione tra controllo e stress moderato, riesce a modulare l'espressione di circa 100 geni, Creso non ne modula nemmeno uno. Questo fenomeno si riscontra anche nei cluster 15 e 19. Come spiegato in precedenza questi cluster contengono molti geni codificanti microtubuli ed enzimi deputati alla sintesi/degradazione della parete cellulare. Per questo motivo una riduzione del loro livello di espressione comporta una riduzione della divisione e distensione cellulare. Il fatto che il loro livello di espressione sia ridotto in seguito a uno stress moderato in CS, mentre per Creso sia necessario uno stress intenso, fa supporre che CS sia maggiormente sensibile nella percezione della carenza d'acqua rispetto a Creso.

Inoltre lo studio dei trascrittomi ha permesso di estrapolare informazioni non strettamente inerenti con lo stress idrico:

- 1) è stato identificato un ottimo reference gene il cui livello di espressione in condizioni di stress idrico rimane immutato. Il suo utilizzo si potrà estendere anche a situazioni e genotipi differenti.
- 2) sono stati identificati 91 putative sequenze di trasposoni e retrotrasposoni con elevata attività trascrizionale in situazioni di particolari combinazioni di stress (mutazione cromosomica e moderato stress idrico).
- 3) in base al livello d'espressione sono stati collocati geni sul genoma D e sul braccio lungo del cromosoma 5A.

RIASSUNTO

Lo stress idrico durante la fase di riempimento delle cariossidi ha un marcato effetto sulla produzione poiché determina una riduzione del numero delle cellule dell'endosperma e, di conseguenza, della capacità di accumulare sostanza secca. In questo lavoro per osservare la risposta molecolare in frumento e la sua correlazione con la presenza o assenza di determinate regioni cromosomiche, è stata condotta una analisi dei profili trascrizionali su tre genotipi: un frumento tenero (Chinese Spring – CS), una sua linea di delezione (CS_5AL-10) e un frumento duro (Creso).

L'analisi del trascrittoma fra le due specie ha messo in evidenza 8552 probe sets con livelli di espressione significativamente differenti. Lo stress idrico, invece, ha causato la variazione di espressione di 3056 probe sets. Fra questi è stato possibile individuare gruppi di geni con andamenti di espressione simili fra i tre genotipi. Tuttavia altri gruppi hanno mostrato comportamenti differenti a seconda della struttura genomica di Creso, CS e CS_5AL-10. Inoltre l'approccio dell'analisi di espressione fra genotipi con struttura ge-

nomica differente ha permesso di identificare geni posizionati sul genoma D e sul braccio lungo del cromosoma 5A, successivamente verificati tramite PCR. L'analisi funzionale dei geni differenzialmente espressi in condizione di stress idrico ha evidenziato che geni appartenenti alle vie metaboliche dell'ABA, prolina, glicina-betaina e del sorbitolo sono indotti da carenza idrica. Allo stesso modo sono stati identificati una serie di sequenze correlate con trasposoni e retrotrasposoni che si attivano solo nella linea di delezione e in seguito a moderati stress idrici.

ABSTRACT

Water stress during grain filling has a marked effect on grain yield, leading to a reduced endosperm cell number and thus sink capacity to accumulate dry matter. The bread wheat cultivar Chinese Spring (CS), a Chinese Spring terminal deletion line (CS_5AL-10) and the durum wheat cultivar Creso were subjected to transcriptional profiling after exposure to mild and severe drought stress at the grain filling stage to find evidences of differential stress responses associated to different wheat genome regions.

The transcriptome analysis of Creso, CS and its deletion line revealed 8,552 non redundant probe sets with different expression levels, mainly due to the comparisons between the two species. The drought treatments modified the expression of 3,056 probe sets. Besides a set of genes showing a similar drought response in Creso and CS, cluster analysis revealed several drought response features that can be associated to the different genomic structure of Creso, CS and CS_5AL-10. Some drought-related genes were expressed at lower level (or not expressed) in Creso (which lacks the D genome) or in the CS_5AL-10 deletion line compared to CS. The chromosome location of a set of these genes was confirmed by PCR-based mapping on the D genome (or the 5AL-10 region). Many clusters were characterized by different level of expression in Creso, CS and CS_5AL-10, suggesting that the different genome organization of the three genotypes may affect plant adaptation to stress. Clusters with similar expression trend were grouped and functional classified to mine the biological mean of their activation or repression. Genes involved in ABA, proline, glycine-betaine and sorbitol pathways were found up-regulated by drought stress. Furthermore, the enhanced expression of a set of transposons and retrotransposons was detected in CS_5AL-10.

Bread and durum wheat genotypes were characterized by a different physiological reaction to water stress and by a substantially different molecular response. The genome organization accounted for differences in the expression level of hundreds of genes located on the D genome or controlled by regulators located on the D genome. When a genomic stress (deletion of a chromosomal region) was combined with low water availability, a molecular response based on the activation of transposons and retrotransposons was observed.

BIBLIOGRAFIA

ATTIENZA S.G., FACCIOLI P., PERROTTA G., DALFINO G., ZSCHIESCHE W., HUMBECK K., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (2004): *Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions*, «Plant Science», 167, pp. 1359-1365.

- BENJAMINI Y., HOCBERG Y. (1995): *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*, «Journal of the Royal Statistical Society», 57, pp. 289-300.
- CATTIVELLI L., RIZZA F., BADECK FW., MAZZUCOTELLI E., MASTRANGELO A.M., FRANCA E., MARÈ C., TONDELLI A., STANCA A.M. (2008): *Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics*, «Field Crops Research», 4, pp. 1-14.
- CATTIVELLI L., BALDI P., CROSATTI C., DI FONZO N., FACCIOLI P., GROSSI M., MASTRANGELO A.M., PECCHIONI N., STANCA A.M. (2002): *Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 649-665.
- CHEN T.H., MURATA N. (2002): *Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 250-257.
- CHEN J.J., WANG S-J., TSAI C-A., LIN C-J. (2007): *Selection of differentially expressed genes in microarray data analysis*, «The Pharmacogenomics Journal», 7, pp. 212-220.
- CHOI H., HONG J.H., HA J., KANG J.Y., KIM S.Y. (2000): *ABFs, a family of ABA-responsive elements binding factors*, «Journal of Biological Chemistry», 275, pp. 1723-1730.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987): *Signal-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*, «Analytical Biochemistry», 162, pp. 156-159.
- COEN E.S., CARPENTER R., ARTIN C. (1986): *Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in Antirrhinum majus*, «Cell», 47, pp. 285-296.
- CRAMER G.R., ERGÜL A., GRIMPLET J., TILLET R.L., TATTERSALL E.A.R., BOHLMAN M.C., VINCENT D., SONDEREGGER J., EVANS J., OSBORNE C., QUILICI D., SCHLAUCH K.A., SCHOOLEY D.A., CUSHMAN J.C. (2007): *Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles*, «Functional and Integrative Genomics», 7, pp. 111-134.
- CZECHOWSKI T., STITT M., ALTMANN T., UDVARDI M.K., SCHEIBLE W-R. (2005): *Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis*, «Plant Physiology», 139, pp. 5-17.
- DELAUNEY A.J., HU C.A., KISHOR B.P., VERMA D.P. (1993): *Cloning of Ornithine delta-aminotransferase cDNA from Vigna aconitifolia by trans-complementation in Escherichia coli and regulation of proline biosynthesis*, «Journal of Biological Chemistry», 268, pp. 18673-18678.
- DUANGSRISAI S., YAMADA K., BANTOG N.A., SHIRATAKE K., KANAYAMA Y., YAMAKI S. (2007): *Presence and expression of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and sorbitol-6-phosphate dehydrogenase genes in strawberry*, «Journal of Horticulture Science and Biotechnology», 82, pp. 191-198.
- EL-TAYEB M.A. (2005): *Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid*, «Plant Growth Regulation», 45, pp. 215-224.
- GAUTIER L., COPE L., BOLSTAD B.M., IRIZARRY R.A. (2004): *Affy - an R package for the analysis of affymetrix genechip data at the probe level*, «Bioinformatics», 20, pp. 307-315.
- FACCIOLI P., CICERI G.P., PROVERO P., STANCA A.M., MORCIA C., TERZI V. (2007): *A combined strategy of "in silico" transcriptome analysis and web search engine optimization*

- allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies, «Plant Molecular Biology», 63, pp. 679-688.
- HAAKE V., COOK D., RIECHMANN J.L., PINEDA O., THOMASHOW M.F., ZHANG J.Z. (2002): *Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis*, «Plant Physiology», 130, pp. 639-648.
- HEYER L.J., KRUGLYAK S., YOSEPH S. (1999): *Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes*, «Genome Research», 9, pp. 1106-1115.
- HU C.A., DELAUNEY A.J., VERMA D.P.S. (1992): *A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants*, «Proceedings of the National Academy of Sciences USA», 89, pp. 9354-9358.
- IRIZARRY R.A., HOBBS B., COLIN F., BEAZER-BARCLAY Y.D., ANTONELLIS K., SCHERF U., SPEED T.P. (2003): *Exploration, normalization and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*, «Biostatistics», 4, pp. 249-264.
- IRIZARRY R.A., GAUTIER L., BOLSTAD B.M., MILLER C. (2006): *Affy: Methods for Affymetrix Oligonucleotide Arrays*, «R package version 1.12.1».
- IVASHUTA S., NAUMKINA M., GAU M., UCHIYAMA K., ISOBE S., MIZUKAMI Y., SHIMAMOTO Y. (2002): *Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimatation of alfalfa (Medicago sativa)*, «Plant Journal», 31, pp. 615-627.
- IUCHI S., KOBAYASHI M., TAJI T., NARAMOTO M., SEKI M., KATO T., TABATA S., KAKUBARI Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2001): *Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis*, «The Plant Journal», 27, pp. 325-333.
- KASHKUSH K., FELDMAN M., LEVY A.A. (2003): *Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat*, «Nature Genetics», 33, pp. 102-106.
- KAVI KISHOR P.B., HONG Z., MIAO G.H., HU C.A.A., VERMA D.P.S. (1995): *Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmo-tolerance in transgenic plants*, «Plant Physiology», 108, pp. 1387-1394.
- KIRCH H.H., SCHLINGENSIEPEN S., KOTCHONI S., SUNKAR R., BARTELS D. (2005): *Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in Arabidopsis thaliana*, «Plant Molecular Biology», 57, pp. 315-332.
- KIYOSUE T., YOSHIDA Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1996): *A gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is up-regulated by proline but down-regulated by dehydration in Arabidopsis*, «Plant Cell», 8, pp. 1323-1335.
- KNIGHT H. (2000): *Calcium signaling during abiotic stress in plant*, «International Review of Cytology», 195, pp. 269-324.
- LEE P.D., SLADEK R., GREENWOOD C.M.T., HUDSON T.J. (2001): *Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies*, «Genome Research», 12, pp. 292-297.
- LIU X.D., SHEN Y.G. (2004): *NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, Dunaliella salina*, «FEBS Letters», 569, pp. 337-340.
- LIU B., WENDEL J.F. (2000): *Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants*, «Genome», 43, pp. 874-880.
- LO BIANCO R., RIEGER M., SUNG S.J.S. (2000): *Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach*, «Physiologia Plantarum», 108, pp. 71-78.

- MADLUNG A., COMAI L. (2004): *The effect of stress on genome regulation and structure*, «Annals of Botany», 94, pp. 481-495.
- MARÈ C., MAZZUCOTELLI E., CROSATTI C., FRANCA E., STANCA AM., CATTIVELLI L. (2004): *Hv-WRKY38: a new transcription factor invlved in cold- and drought-response in barley*, «Plant Molecular biology», 55, pp. 399-416.
- MITTLER R. (2002): *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*, «Trends Plant Sciences», 7, pp. 405-410.
- NANJIO T., KOBAYASHI M., YOSHIDA Y., KAKUBARI Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1999): *Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in Arabidopsis thaliana*, «FEBS letters», 461, pp. 205-210.
- QIN X., ZEEVART J.A.D. (1999): *The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water stressed bean*, «Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA», 96, pp. 15354-15361.
- RAPP R.A., WENDEL J.F. (2005): *Epigenetics and plant evolution*, «New Phytologist», 168, pp. 81-91.
- RIZZA F., BADECK FW., CATTIVELLI L., LI DESTRI O., DIFONZO N., STANCA AM. (2004): *Use of water stress index to identify barley genotypes adapted to rainfed and irrigated conditions*, «Crop Science», 44, pp. 2127-2137.
- RONCARATI R., SALAMINI F., BARTELS D. (1995): *An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function*, «Plant Journal», 7, pp. 809-822.
- RUEPP A., ZOLLNER A., MAIER D., ALBERMANN K., HANI J., MOKREJS M., TETKO I., GULDENER U., MANNHAUPT G., MUNSTERKOTTER M., MEWES H.W. (2004): *The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes*, «Nucleic Acids Research», 32, pp. 5539-5545.
- SAKUMA Y., MARUYAMA K., OSAKABE Y., QIN F., SEKI M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2006): *Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression*, «Plant Cell», 18, pp. 1292-1309.
- SAKUMA Y., LIU Q., DUBOUZET J.G., ABE H., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2002): *DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression*, «Biochemical and Biophysical Research Communications», 290, pp. 998-1009.
- SANDERS D., BROWNLEE C., HARPER J.F. (1999): *Communicating with calcium*, «Plant Cell», 11, pp. 691-706.
- SEKI M., NARUSAKA M., ISHIDA J. ET AL. (2002a): *Monitoring the expression profiles of ca. 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray*, «The Plant Journal», 31, pp. 279-292.
- SEKI M., ISHIDA J., NARUSAKA M. ET AL. (2002b): *Monitoring the expression pattern of ca. 7000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray*, «Functional and Integrative Genomics», 2, pp. 282-291.
- SEO M., KOSHIBA T. (2002): *Complex regulation of ABA biosynthesis in plants*, «Trends in Plant Sciences», 7, pp. 41-48.
- SHAKIROVA F.M., SAKHABUTDINOVA A.R., BEZRUKOVA M.V., FATKHUTDINOVA R.A., FATKHUTDINOVA D.R. (2003): *Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity*, «Plant Science», 164, pp. 317-322.
- SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2007): *Gene networks involved in drought stress response and tolerance*, «Journal of Experimental Botany», 58, pp. 221-227.

- SODERMAN E., MATTSSON J., ENGSTROM P. (1996): *The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid*, «Plant Journal», 10, pp. 375-381.
- SUZUKI T., HIGGINS P.J., CRAWFORD D.R. (2000): *Control selection for RNA quantitation*, «Biotechniques», 29, pp. 332-337.
- TABATA T., NAKAYAMA T., MIKAMI K., IWABUCHI M. (1991): *HBP-1a and HBP-1b: leucine zipper-type transcription factors of wheat*, «EMBO Journal», 10, pp. 1459-1467.
- TAKAHASHI S., KATAGIRI T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2000): *An Arabidopsis Gene Encoding a Ca^{2+} -Binding Protein is Induced by Abscisic Acid during Dehydration*, «Plant and Cell Physiology», 41, pp. 898-903.
- THELLIN O., ZORZI W., LAKAYE B., DE BORMAN B., COUMANS B., HENNE G., GRISAR T., IGOUT A., HEINEN E. (1999): *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*, «Journal of Biotechnology», 75, pp. 197-200.
- TROVATO M., MARAS B., LINHARES F., COSTANTINO P. (2001): *The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase*, «Proceedings of the National Academy USA», 98, pp. 13449-13453.
- UMEZAWA T., YOSHIDA R., MARUYAMA K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2004): *SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana*, «Proceedings of the National Academy USA», 101, pp. 17306-17311.
- UMEZAWA T., FUJITA M., FUJITA Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2006a): *Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future*, «Current Opinion in Biotechnology», 17, pp. 113-122.
- UMEZAWA T., OKAMOTO M., KUSHIRO T., NAMBARA E., OONO Y., SEKI M., KOBAYASHI M., KOSHIBA T., KAMIYA Y., SHINOZAKI K. (2006b): *CYP707A3, a major ABA 8#-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana*, «The Plant Journal», 46, pp. 171-182.
- YEUNG K.Y., RUZZO W.L. (2001): *Principal component analysis for clustering gene expression data*, «Bioinformatics», 17, pp. 763-774.
- YOSHIBA Y., KIYOSUE T., KATAGIRI T., UEDA H., MIZOGUCHI T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., WADA K., HARADA Y., SHINOZAKI K. (1995): *Correlation between the induction of a gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress*, «Plant Journal», 7, pp. 751-760.
- ZHANG J.Z., CREELMAN R.A., ZHU J.K. (2004): *From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops*, «Plant Physiology», 135, pp. 615-621.

Un approccio innovativo per l'identificazione di geni coinvolti nella sintesi della vitamina C nel frutto di pomodoro

INTRODUZIONE

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle tre colture più importanti al mondo, con una produzione di 126 milioni di tonnellate nel 2007 (FAO-STAT - <http://faostat.fao.org/>). Sebbene sia una pianta tropicale, il pomodoro è coltivato in quasi ogni angolo del pianeta, dai tropici al Circolo Polare Artico. Spesso è cresciuto in serra, laddove la produzione esterna è limitata a causa delle basse temperature. I maggiori paesi produttori in ordine decrescente sono Cina, Usa, India, Turchia, Egitto e Italia. Negli ultimi anni, la sua produzione globale è aumentata di circa il 10%.

Il pomodoro rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, vitamine e minerali (Frusciante et al., 2007), e ciò è di notevole interesse per la salute umana. Infatti, recentemente è stato dimostrato che metaboliti secondari quali composti fenolici, acido ascorbico (AsA o vitamina C) e altre molecole antiossidanti appartengono a un importante gruppo di fitonutrienti responsabili, in parte, dell'effetto protettivo contro alcune malattie croniche e degenerative (Demming-Adams e Adams 2002). In particolare, frutta fresca e verdura, come arance e pomodori, sono la principale fonte di vitamina C per uomo, primati, mammiferi e pochi altri passeriformi, che non sono in grado di sintetizzare questa vitamina a causa di mutazioni nel gene che controlla l'ultimo step della via biosintetica.

In generale, le proprietà benefiche per la salute umana di molti metaboliti secondari delle piante hanno fatto sì che, negli ultimi anni, l'attenzione del

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

miglioramento genetico vegetale si focalizzasse sul controllo della loro biosintesi e del loro accumulo nelle diverse specie vegetali (Raskin et al., 2002). Per il pomodoro la conseguenza di tale interesse è stata che, sebbene in Europa il miglioramento genetico di tale specie sia iniziato più di 200 anni fa, avendo obiettivi diversi in accordo con le differenti tipologie del prodotto (da mensa o da industria) e con i diversi sistemi di coltivazione, oggi l'attenzione dei breeder è maggiormente rivolta al miglioramento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del frutto. Tale interesse è particolarmente vivo poiché un aumento del contenuto di vitamina C in pomodoro può anche contribuire a migliorare la tolleranza a stress, sia biotici sia abiotici (Davey et al., 2000; Muckenschnabel et al., 2002; Kuzniak e Sklodowska, 2005) e la qualità del frutto in post-raccolta (Davey e Keulemans, 2004; Malacrida et al., 2006).

Il lavoro di "breeding" mirato all'ottenimento di varietà con migliori caratteristiche qualitative è tuttavia complicato dalla complessità genetica dei caratteri oggetto di studio. Infatti, la maggior parte dei parametri di qualità del frutto ha eredità quantitativa mostrando una variazione continua, fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. La variazione genetica di tali caratteri è dovuta all'azione congiunta di molti geni (QTL, Quantitative Trait Loci), i quali possono essere mappati sul genoma con l'ausilio di marcatori molecolari (Tanksley, 1993). Un approccio di analisi QTL è già stato utilizzato per localizzare regioni genomiche che controllano tratti quantitativi del pomodoro trasformato (Barone et al., 2008). Alcuni QTL per peso del frutto, contenuto di solidi solubili, pH, colore e consistenza del frutto sono stati individuati in diverse popolazioni segreganti provenienti da incroci interspecifici.

Oggi, per il pomodoro sono disponibili numerose risorse genetiche e genomiche che possono facilitare il lavoro d'identificazione di QTL e dei geni candidati al controllo di caratteri quantitativi (Barone et al., 2009). Tra le prime, un notevole contributo all'identificazione di QTL in pomodoro è stato fornito dalle linee di introgressione (Eshed e Zamir, 1994), linee che consentono di avere una collezione permanente di segmenti cromosomici omozigoti di una specie selvatica nel background genetico della specie coltivata (fig. 1). Tali linee consentono, perciò, di ripetere le prove più volte sia nel tempo sia nello spazio, presupposto fondamentale per lo studio dei caratteri quantitativi.

Tra le risorse genomiche disponibili, esistono diverse piattaforme per l'analisi trascrittomica che consente di evidenziare il livello di espressione degli RNA messaggeri su scala genomica in determinati tessuti o stadi di svilup-

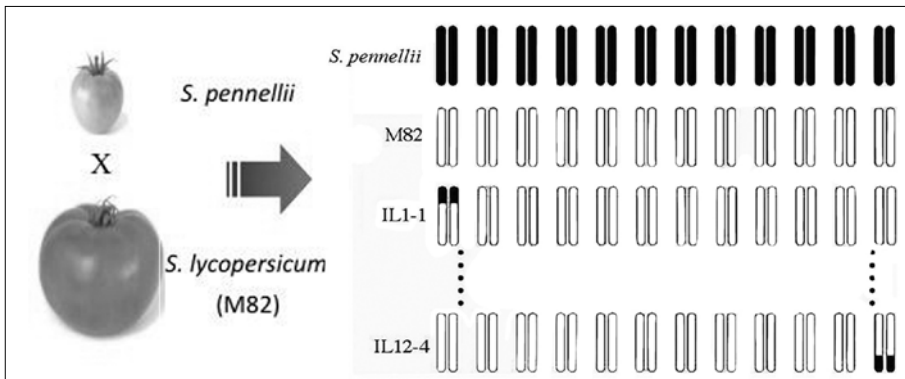


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle linee di introgressione ottenute dall'incrocio tra *S. pennellii* e *S. lycopersicum* (in nero è rappresentato il genoma della specie selvatica, in bianco quello della specie coltivata)

po della pianta, e quindi di individuare potenziali geni coinvolti nel controllo dei caratteri oggetto di studio (Minic et al., 2009). Tali piattaforme, infatti, permettono di fotografare l'insieme di trascritti in una determinata condizione fisiologica, e tra questi di identificare quelli il cui livello di espressione è associato al fenotipo d'interesse.

Scopo del presente lavoro è l'identificazione di potenziali QTL coinvolti nel controllo del contenuto di acido ascorbico (AsA) nel frutto di pomodoro, mediante un approccio di genomica che combina l'uso di risorse genetiche, quali le linee di introgressione, con l'uso di risorse genomiche, quali un chip per l'analisi trascrittomica di geni differenzialmente espressi nel frutto allo stadio di completa maturazione.

MATERIALI & METODI

Materiale vegetale

Una popolazione di circa 50 linee d'introgressione *S. lycopersicum* (var. M82) x *S. pennellii* è stata coltivata in vaso in serra fredda, per tre anni consecutivi. Per ogni linea d'introgressione sono state coltivate da tre a cinque repliche in blocchi randomizzati. I frutti sono stati raccolti da ciascuna pianta allo stadio di rosso maturo e successivamente utilizzati per l'estrazione e la quantificazione dell'AsA.

Estrazione e quantificazione dell'Ascorbato (AsA)

La polpa delle bacche è stata introdotta in tubi Eppendorf da 2 ml con una biglia di acciaio e subito congelata in azoto liquido. Quindi i tubi sono stati sottoposti a omogeneizzazione simultanea in Tissue Lyzer (Retsch QIA-GEN) attraverso 2 cicli consecutivi da 1 min a 50 Hz seguiti da altri due cicli della stessa durata e frequenza dopo aver aggiunto ai tubi il tampone di estrazione. I detriti cellulari sono stati separati per centrifugazione e l'estratto è stato utilizzato per il saggio successivo. L'estrazione e la quantificazione dell'AsA è stata condotta secondo il protocollo riportato da Kampfenkel et al. (1995). Il metodo si basa sulla riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} da parte dell'AsA e sulla determinazione spettrofotometrica a 525 nm del Fe^{2+} complessato con il 2,2'-dipiridilio. L'assorbanza misurata allo spettrofotometro è stata convertita in quantità di AsA attraverso le equazioni di rette di taratura realizzate allo scopo. Tali rette di taratura sono state ottenute misurando l'assorbanza a 525 nm in reazioni contenenti quantità note (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 μmol) di AsA.

Analisi statistica della popolazione

L'analisi statistica per il contenuto di AsA dell'intera popolazione di linee d'introgresione è stata condotta utilizzando il software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versione 15.0. La significatività dei QTL è stata determinata paragonando il valore medio di ogni singola IL al controllo M82 attraverso l'analisi One-way-ANOVA con un LSD post-hoc test a 0.05 di significatività. La presenza di un QTL è stata ipotizzata quando l'introgresione ha mostrato un effetto significativo almeno su tre anni.

Estrazione RNA

L'RNA totale è stato isolato dagli stessi frutti utilizzati per l'analisi del contenuto di AsA secondo il protocollo di Griffiths et al. (1999). Successivamente, l'RNA antisenso (aRNA) è stato sintetizzato con l'uso del SuperScriptTM Indirect RNA Amplification System Kit (Invitrogen Catalog no. L1016-02) e marcato con il fluoroforo Alexa Fluor 647 Reactive Dye. L'RNA così ottenuto è stato ibridato sul chip per l'analisi trascrittomica. Sono state effettuate 3 repliche per ciascun genotipo con RNA estratto da frutti di 2 anni (2007 e 2008).

Disegno del chip

L'analisi trascrittomiche è stata condotta sul chip 90K TomatoArray1.0 sintetizzato su piattaforma COMBIMATRIX alla Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dell'Università di Verona, nell'ambito di una collaborazione con il prof. Mario Pezzotti e il prof. Massimo Delledonne. Il chip contiene 90.000 elettrodi di silicio su cui sono sintetizzate in situ 20200 sonde di DNA, ciascuna replicata 4 volte. Ogni sonda è stata disegnata da un diverso Tentative Consensus (TC) estratto dal Database TIGR *Lycopersicon esculentum* Gene Index Release 11.0 (21 giugno, 2006). Sul chip sono state inserite anche nove sequenze batteriche utilizzate come controllo negativo, fornite dalla piattaforma COMBIMATRIX. L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle ibridazioni è stata eseguita utilizzando il software TIGR Multiple Experiment Viewer versione 4.0 (<http://www.tigr.org/software/tm4/> - Saeed et al., 2003). In seguito, grazie al software Blast2GO (<http://blast2go.bioinfo.cipf.es/> - Conesa et al., 2005) è stata ottenuta l'annotazione automatica, la Gene Ontology (GO) e la categorizzazione di tutti i TC differenzialmente espressi.

RISULTATI E DISCUSSIONI

L'approccio proposto nel presente lavoro si basa sull'uso integrato di specifiche risorse genetiche e genomiche disponibili per il pomodoro, allo scopo di identificare regioni cromosomiche (QTL) e geni candidati per il controllo del contenuto di AsA nei frutti di pomodoro. L'uso di risorse genetiche quali le linee di introgressione (IL) è stato già descritto per l'analisi di diversi caratteri quantitativi in pomodoro, e ha consentito l'identificazione di molti QTL per caratteristiche legate alla produzione e alla qualità dei frutti (Lippman et al., 2007). La novità del lavoro risiede nel combinare l'uso di tali linee con una nuova piattaforma di trascrittomica, per poter definire quali sono i potenziali geni candidati. In particolare, l'analisi trascrittomiche è stata condotta mediante uso di un chip microarray realizzato con tecnologia Combimatrix. Su tale chip, sono stati sintetizzati piccoli frammenti di sequenze geniche (sonde di circa 35 paia di basi), che rappresentano una collezione dei geni o sequenze EST già noti per il pomodoro, e che pertanto consentono un'analisi completa del trascrittoma di pomodoro, sicuramente paragonabile con quella di altre piattaforme di trascrittomica oggi disponibili per tale specie, quali i chip Tom1 e Tom2 (Alba et al., 2005). Inoltre, sul chip utilizzato ciascuna sonda

è stata replicata 3-4 volte e, dato che la tecnologia Combimatrix consente di riutilizzare 4-5 volte lo stesso chip per ibridazioni consecutive, la scelta di tale piattaforma trascrittomica aggiunge il vantaggio della riduzione dei costi dell'analisi.

In particolare, la strategia proposta nel presente lavoro ha visto coinvolte due fasi successive: l'analisi fenotipica volta alla identificazione di regioni cromosomiche (QTL) che regolano il contenuto dell'AsA, e quindi l'analisi trascrittomica per l'identificazione dei geni candidati che risiedono nelle regioni QTL individuate o che sono a esse correlate. Per l'analisi fenotipica si è proceduto alla determinazione del contenuto di AsA nel frutto delle linee di introgressione, mentre per l'analisi trascrittomica si è ricorso all'ibridazione dell'RNA dei frutti di pomodoro sul chip TomatArray1.0.

Contenuto di ascorbato (AsA) nella popolazione IL di S. pennellii

Allo scopo di identificare QTL coinvolti nel controllo della biosintesi e dell'accumulo di AsA, è stata effettuata la misurazione del contenuto di AsA in frutti raccolti allo stadio di rosso maturo provenienti dalle singole linee d'introgressione per tre anni consecutivi (2006-2007-2008). In figura 2 sono riportati i risultati medi dei tre anni del contenuto di AsA per le tre linee IL 7-3, IL 10-1 e IL 12-4. In particolare, queste linee hanno mostrato una variazione significativa del contenuto di AsA rispetto al controllo M82 in ognuna delle tre annate di prova, consentendo di identificare tre QTL per tale carattere. Come riportato in figura 2, due di queste IL (IL 7-3 e IL 12-4) presentano un QTL positivo, cioè corrispondente a un aumento del contenuto di AsA, mentre la linea IL 10-1 mostra un QTL negativo corrispondente a una diminuzione dell'AsA. In precedenti studi effettuati sulla stessa popolazione di linee di introgressione alcuni QTL per il contenuto di AsA sono stati identificati anche in differenti linee IL. Comuni ad altri esperimenti sono, invece, sia il QTL della IL 12-4 che quello della IL 10-1 (Rousseaux et al., 2005; Schauer et al., 2006), mentre è la prima volta che è stato riscontrato un QTL per contenuto in AsA nella IL 7-3. L'identificazione di alcuni QTL diversi, riportata in altri lavori, è probabilmente dovuta ai differenti sistemi di allevamento (pieno campo e serra, e tra questi ultimi in suolo o in vaso) e ambienti pedoclimatici. Infatti, come riportato da Toor et al. (2006) il contenuto di AsA nel frutto di pomodoro, come molti altri caratteri quantitativi, è fortemente influenzato dall'ambiente e presenta una tipica distribuzione a campana, con valori quindi che possono mostrare ampia variabilità.

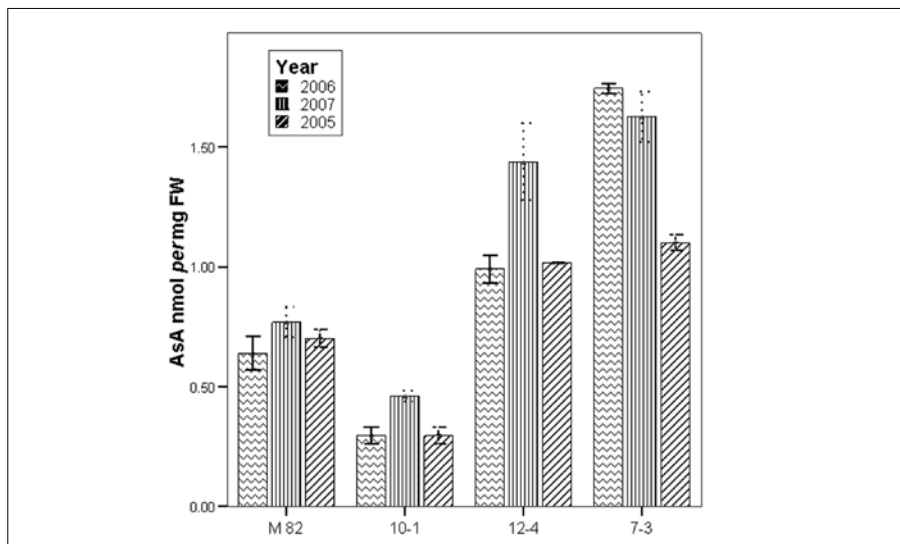


Fig. 2 Contenuto di AsA nel frutto di tre IL selezionate dopo tre anni consecutivi di analisi rispetto al controllo M82. *: linee significativamente differenti dal controllo ($0,01 < P < 0,05$)

Analisi trascrittomic

L'analisi trascrittomic comparativa delle tre linee IL 7-3, IL 12-4 e IL 10-1 rispetto al controllo M82 ha permesso l'identificazione rispettivamente di 260, 253 e 239 trascritti differenzialmente espressi, distinti in sovraespressi e sottoespressi in funzione del rapporto tra l'intensità del segnale di ibridazione della IL e quello del controllo M82. In particolare, nella IL 7-3 su 260 trascritti totali 132 sono sovraespressi e 128 sottoespressi, nella IL 10-1 92 trascritti sovraespressi e 147 sottoespressi, e nella IL 12-4 61 sovraespressi e 192 sottoespressi (tab. 1).

L'analisi dei dati di trascrittomic attraverso il software BLAST2GO ha consentito l'annotazione e la categorizzazione automatica dei trascritti differenzialmente espressi e quindi l'assegnazione di una potenziale funzione in base ai 3 diversi vocabolari di Gene Ontology (GO), e cioè Funzione Molecolare (MF), Processo Biologico (BP) e Componente Cellulare (CC). Nella figura 3 è riportato il risultato di tale categorizzazione. Si può notare che nell'ambito della categorizzazione per CC in tutte e tre le linee IL il maggior numero di trascritti, dopo la categoria non classificati (unknown), afferisce alla categoria mitocondri e plastidi, entrambi coinvolti nella sintesi e nell'ac-

IBRIDAZIONI	TRASCritti TOTALI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI	TRASCritti SOVRAESPRESSI ¹	TRASCritti SOTTOESPRESSI ²
IL 7-3 vs. M 82	260	132	128
IL 12-4 vs. M 82	253	61	192
IL 10-1 vs. M 82	239	92	147
¹ rapporto IL/M82>1			
² rapporto IL/M82<1			

Tab. 1 Numero di trascritti differenzialmente espressi tra ciascuna IL e il controllo M82 (dati medi delle ibridazioni del 2007 e 2008)

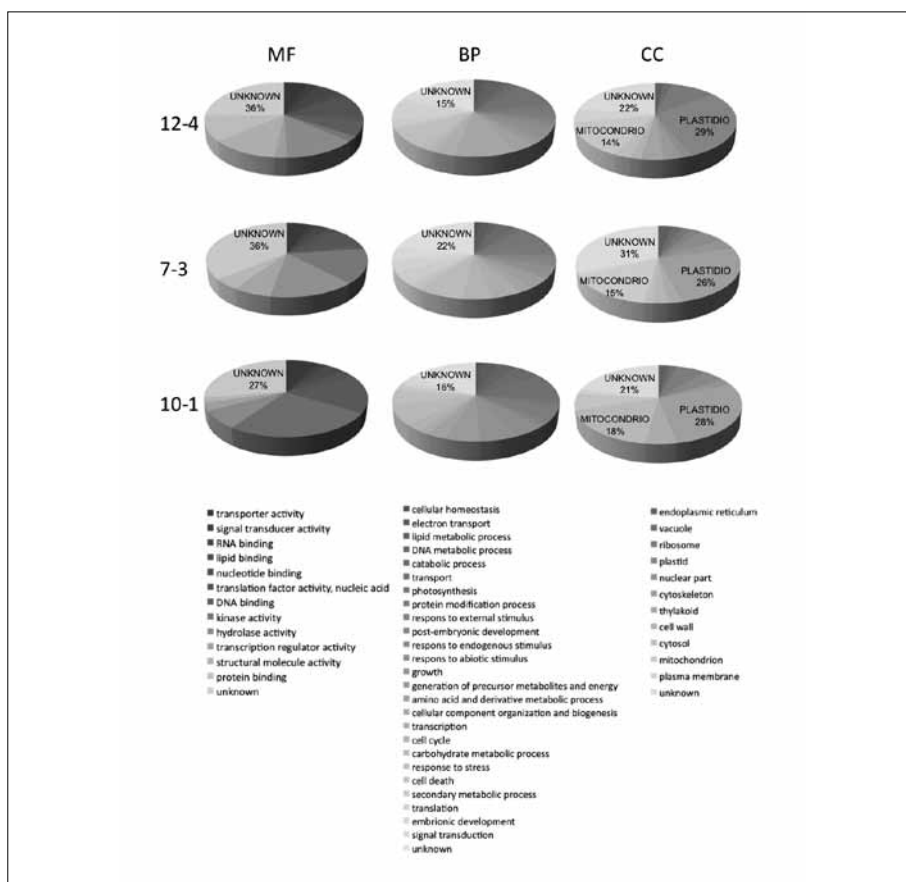


Fig. 3 Categorizzazione mediante BLAST2GO dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti dall'analisi microarray delle linee IL 12-4, IL 7-3, IL 10-1. MF = Funzione Molecolare, BP = Processo Biologico, CC = Componente Cellulare

cumulo dell'AsA in pianta. In generale, il numero di trascritti con funzione non ancora nota è variato da un minimo di 15% nel caso della linea IL12-4 per la categoria BP a un massimo di 36% per la linea IL7-3 per la categoria MF. Per tutti gli altri trascritti si potrà, quindi, attribuire una potenziale funzione, che può consentire di formulare delle ipotesi su quali e quanti geni candidati alla sintesi dell'AsA possono essere identificati. Tale funzione dovrà essere convalidata con opportune analisi funzionali che possono o meno confermare le ipotesi fatte (McGrath et al., 2005).

Da uno studio preliminare sui trascritti a funzione nota o putativamente nota, si evince che un dato rilevante per l'identificazione di geni candidati per il controllo del contenuto di AsA nelle 3 linee di introgressione potrebbe essere dedotto dall'analisi dei trascritti comuni e diversi tra le tre IL. In particolare, confrontando tutti i trascritti condivisi e non (fig. 4), risulta che 2 sono comuni a tutte le IL analizzate; inoltre considerando la divisione in sottoespressi e sovraespressi, entrambi sono sottoespressi. Dieci trascritti sono condivisi tra le IL 7-3 e IL 12-4, di cui 2 sovraespressi e 7 sottoespressi, altri dieci sono condivisi tra le IL 12-4 e IL 10-1, di cui 6 sovraespressi e 3 sottoespressi e, infine, 28 trascritti sono condivisi tra le IL 7-3 e IL 10-1, di cui 10 tra i sovraespressi e 10 tra i sottoespressi. Di tutti questi trascritti comuni, sarà particolarmente interessante indagare la funzione di quelli che hanno uno stesso andamento (sovraespressione o sottoespressione) nei due genotipi che portano a un incremento del contenuto di acido ascorbico, perché potrebbero rappresentare geni chiave per la sintesi e l'accumulo di tale metabolita nel frutto di pomodoro. Inoltre, sono presenti 10 trascritti con andamenti diversi a seconda del genotipo (tab. 2). In particolare, 7 trascritti sono sottoespressi nella IL 7-3 e sovraespressi nella IL 10-1 e viceversa 1 è sovraespresso in IL 7-3 e sottoespresso in IL 10-1. Inoltre, 2 trascritti sono sottoespressi nella IL 12-4 e sovraespressi sia nella IL 7-3 e che nella IL 10-1. Potrebbero essere interessanti quelli di andamento opposto tra le linee con QTL positivo (IL 7-3 e IL 12-4) e la linea con QTL negativo (IL 10-1). Anche questi trascritti, infatti, potrebbero essere di aiuto per capire se ci sono geni chiave nel pathway di sintesi della vitamina C, la cui sovra- o sottoespressione nelle linee con QTL positivi, e l'espressione con andamento opposto nella linea con QTL negativo, possono giustificare l'incremento e la riduzione di vitamina C nelle linee in esame.

Finora, un'analisi più approfondita dei trascritti differenzialmente espressi nella linea IL 12-4 rispetto al controllo M82 ha portato a ipotizzare che ci sia un coinvolgimento del metabolismo dell'etilene nel regolare la maggiore sintesi della vitamina C in tale genotipo e che la degradazione di alcune

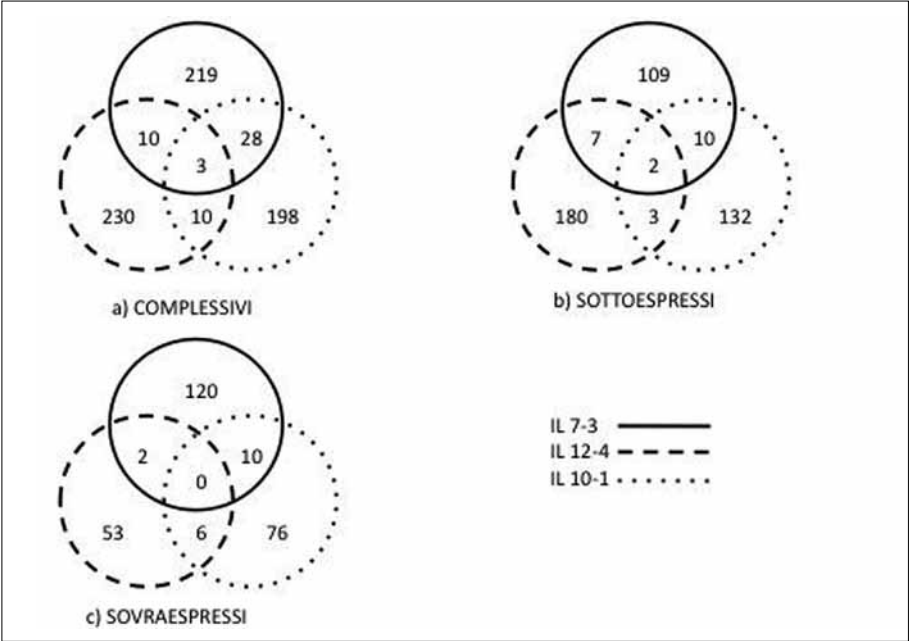


Fig. 4 *Trascritti differenzialmente espressi nelle IL 7-3, IL 10-1 e IL 12-4 rispetto al controllo M82. a) trascritti totali; b) trascritti sottoespressi e c) trascritti sovraespressi*

TRASCritto	IL 7-3	IL 10-1	IL 12-4
8	-	+	
61	-	+	
116	-	+	
209	-	+	
312	-	+	
466	-	+	
500	-	+	
647	+	-	
762		+	-
832	+		-

Tab. 2 *Sovraespressione (+) o sottoespressione (-) di alcuni trascritti differenzialmente espressi nelle tre linee IL studiate mediante analisi microarray*

componenti della parete cellulare possa fornire i precursori per tale sintesi (Di Matteo et al., 2008). Inoltre, analisi preliminari condotte sui trascritti differenzialmente espressi nella linea IL 7-3 fanno supporre, anche in questa linea, il coinvolgimento dell’etilene nel regolare la maggiore sintesi della

vitamina C. In entrambi i casi, tale ipotesi andrà comunque confermata mediante analisi funzionali con piante trasformate e o mediante la tecnica del silenziamento genico.

In conclusione, l'approccio innovativo proposto nel presente lavoro ha consentito di identificare un numero elevato di trascritti e /o putativi geni, il cui reale coinvolgimento nella sintesi e accumulo della vitamina C nel frutto di pomodoro va confermato. Tale approccio, quindi, ha fornito uno strumento di analisi per caratteri quantitativi, che si è dimostrato particolarmente efficace nell'individuare alcuni geni tra quelli che maggiormente possono influenzare il carattere da migliorare per l'ottenimento di nuove varietà da immettere sul mercato, e sui quali potranno essere costruiti marcatori molecolari utili per la selezione assistita.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i prof. Mario Pezzotti e Massimo Delledonne dell'Università di Verona per la preziosa collaborazione nell'allestimento del chip Combimatrix di pomodoro. Il lavoro è stato svolto grazie al contributo del Progetto Agronanotech, finanziato dal MiPAF e del Progetto GenoPom, finanziato dal MiUR.

RIASSUNTO

Il pomodoro rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, vitamine e minerali, e ciò è di notevole interesse per la salute umana. Infatti, recentemente è stato dimostrato che metaboliti secondari quali l'acido ascorbico (AsA o vitamina C) hanno un effetto protettivo contro alcune malattie croniche e degenerative. Il lavoro di "breeding" mirato all'ottenimento di varietà con migliori caratteristiche qualitative è tuttavia complicato dalla complessità genetica dei caratteri oggetto di studio, per la maggior parte dovuti all'azione congiunta di molti geni (QTL, Quantitative Trait Loci). Oggi, per il pomodoro sono disponibili numerose risorse genetiche e genomiche che possono facilitare il lavoro d'identificazione di QTL e dei geni candidati al controllo di caratteri quantitativi. Scopo del presente lavoro è l'identificazione di potenziali QTL e geni candidati coinvolti nel controllo del contenuto di AsA nel frutto di pomodoro, mediante un approccio che combina l'uso di risorse genetiche e genomiche. Sono state identificate 3 linee di introgressione di *S. pennellii*, 2 con un elevato contenuto di AsA e una con un basso contenuto. Per effettuare un'analisi trascrittomiche l'RNA estratto da tali linee è stato ibridato su un chip COMBIMATRIX. È stato così identificato un set di trascritti differenzialmente espressi nelle tre linee che potrà essere utilizzato per identificare i geni candidati al controllo del contenuto di AsA nel frutto di pomodoro.

ABSTRACT

Tomato fruit is precious source of nutritional compounds, among which ascorbic acid (AsA), that can help to protect against human diseases, such as cancer and cardiovascular ones. In addition, in plants it plays a crucial role as co-factor, antioxidant and precursor. In order to increase AsA content in fruit a deep understanding on the genetic control of its synthesis and storage is required. The purpose of the present work was to identify QTLs and candidate genes, which can increase AsA content in tomato fruit, with the final aim of pyramiding them into cultivated varieties. The approach used was to combine tomato introgression lines with the transcriptomic analysis that allows to investigate the expression level of thousand of genes contemporarily. Fifty *S. pennellii* introgression lines were screened for AsA content in fruit during three years and three of them were selected since they significantly differed from the cultivated genotype M82 over all the three years. Two of them showed a higher AsA content, one a lower content. Total RNA was extracted from fruit and hybridized on the Combimatrix 90k TomatArray 1.0. A group of over-expressed and under-expressed probes in the three ILs *vs.* M82 comparison were found. Using a bioinformatic approach, many differentially expressed tentative consensus (TCs) were also annotated and classified according to the Gene Ontology vocabulary. This selected collection of TCs will be useful to better investigate the genetic control of mechanisms leading to an increased AsA content in tomato fruit.

BIBLIOGRAFIA

- ALBA R., PAYTON P., FEI Z., MCQUINN R., DEBBIE P., MARTIN G.B., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J. (2005): *Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development*, «Plant Cell.», 11, pp. 2954-65.
- BARONE A., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., GIULIANO G., GRANDILLO S., FRUSCIANTE L. (2008): *Structural and functional genomics of tomato*, «Intl J Plant Genomics», pp. 1-12, doi 10.1155/2008/820274.
- BARONE A., DI MATTEO A., CARPUTO D., FRUSCIANTE L. (2009): *High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency*, «Curr Genomics», 10, pp. 1-9.
- CONESA A., GÖTZ S., GARCÍA-GÓMEZ J.M., TEROL J., TALÓN M., ROBLES M. (2005): *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*, «Bioinformatics», 21, pp. 3674-3676.
- DAVEY M.W., KEULEMANS J. (2004): *Determining the potential to breed for enhanced antioxidant status in Malus: mean inter- and intravarietal fruit vitamin C and glutathione contents at harvest and their evolution during storage*, «J Agric Food Chem», 52, pp. 8031-8038.
- DAVEY M.W., VAN MONTAGU M., INZE D., SANMARTIN M., KANELIS A., SMIRNOFF N., BENZIE IJJ., STRAIN JJ., FAVELL D., FLETCHER J., ET AL. (2000): *Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*, «J Sci Food Agric», 80, pp. 825-860.
- DEMMING-ADAMS & ADAMS (2002): *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition*, «Science», 298, pp. 2149-53.

- DI MATTEO A., SACCO A., PEZZOTTI M., DELLEDONNE M., FERRARINI A., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2008): *Transcriptomic comparative analysis for tomato fruit quality traits through the Combimatrix technology*, «5th Solanaceae Genome Workshop» Cologne (Germany), 12-16 October 2008, p. 289
- ESHED Y., ZAMIR D. (1994): *A genomic library of Lycopersicon pennellii in L. esculentum: a tool for fine mapping of genes*, «Euphytica», 79, pp. 175-178.
- FAOSTAT (2005): FAOSTAT statistics division. *FAOSTAT/Food and Agriculture Organization of the United Nations*, «Vol. 2007».
- FRUSCIANTE L., CARLI P., ERCOLANO MR., PERNICE R., DI MATTEO A., FOGLIANO V., PELLEGRINI N. (2007): *Antioxidant nutritional quality of tomato*, «Mol. Nutr. Food Res.», 51 (5), pp. 609-617.
- GRIFFITHS A., BARRY C., ALPUCHE-SOLIS A.G. AND GRIERSON D. (1999): *Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening*, «J. Exp. Bot.», 50 (335), pp. 793-798.
- KAMPFENKEL K., VAN MONTAGU M., INZE D. (1995): *Effects of Iron Excess on Nicotiana plumbaginifolia Plants (Implications to Oxidative Stress)*, «Plant Physiol», 107, pp. 725-735.
- KUZNIAK E., SKLODOWSKA M. (2005): *Fungal pathogen-induced changes in the anti-oxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants*, «Planta», 222, pp. 192-200.
- LIPPMAN Z.B., SEMEL Y., ZAMIR D. (2007): *An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines*, «Curr Opin Genetics & Dev.», 17, pp. 545-552.
- MALACRIDA C., VALLE E.M., BOGGIO S.B. (2006): *Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom*, «Physiol Plant», 127, pp. 10-15.
- MCGRATH K.C., DOMBRECHT B., MANNERS J.M., SCHENK P.M., EDGAR C.I., MACLEAN D.J., SCHEIBLE W.R., UDVARDI M.K., KAZAN K. (2005): *Repressor- and Activator-Type Ethylene Response Factors Functioning in Jasmonate Signaling and Disease Resistance Identified via a Genome-Wide Screen of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression*, «Plant Physiol», 139, pp. 949-959.
- MINIC Z., JAMET E., SAN-CLEMENTE H., PELLETIER S., RENOU J.P., RIHOUEY C., OKINYO D., PROUX C., LEROUGE P., JOUANIN L. (2009): *Transcriptomic analysis of Arabidopsis developing stems: a close-up on cell wall genes*, «BMC Plant Biol», 9, pp. 1-6.
- MUCKENSCHNABEL I., GOODMAN BA., WILLIAMSON B., LYON GD., DEIGHTON N. (2002): *Infection of leaves of Arabidopsis thaliana by Botrytis cinerea: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products*, «J Exp Bot», 53, pp. 207-214.
- RASKIN I., RIBNICKY D.M., KOMARNYTSKY S., ILIC N., POULEV A., BORIJUK N., BRINKER A., MORENO D.A., RIPOLI C., YAKOBY N., O'NEAL J.M., CONRWELL T., PASTOR I., FRIDLENDER B. (2002): *Plants and human health in the twenty-first century*, «Trends in Biotechnol», 20 (12), pp. 522-531.
- ROUSSEAU M.C., JONES C.M., ADAMS D. (2005): *QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using Lycopersicon pennellii introgression lines*, «Theor. Appl. Genet.», 111, pp. 1396-1408.
- SAEED A.I., SHAROV V., WHITE J., LI J., LIANG W., BHAGABATI N., BRAISTED J., KLAPE M., CURRIER T., THIAGARAJAN M., ET AL. (2003): *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*, «Biotechniques», 34, pp. 374-378.
- SCHAUER N., SEMEL Y., ROESSNER U., GUR A., BALBO I., CARRARI F., PLEBAN T., PEREZ-MELIS A., BRUEDIGAM C., KOPKA J., WILLMITZER L., ZAMIR D., FERNIE A.R. (2006):

- Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement*, «Nat Biotechnol», 24, pp. 447-454.
- TANKSLEY S.D. (1993): *Mapping polygenes*, «Ann Rev Gen», 27, pp. 205-233.
- TOOR R.K., SAVAGE G.P., LISTER C.E. (2006): *Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes*, «J Food Compos Anal», 19, pp. 1-10.

DONATO PASTORE^{*,**}, MARIO SOCCIO^{*,**}, ELIDE FORMENTIN^{***},
FIORELLA LO SCHIAVO^{***}

Identificazione di un canale mitocondriale del potassio come possibile strumento per migliorare la resistenza agli stress abiotici in frumento duro

INTRODUZIONE

L'esistenza di un canale mitocondriale del K^+ sensibile all'ATP in specie vegetali è stata dimostrata per via funzionale per la prima volta nel 1999 in frumento duro (Pastore et al., 1999). In analogia con la controparte animale (*Mitochondrial Potassium channel- ATP sensitive*, mitoK_{ATP}, Paucek et al., 1992) questo canale è stato chiamato *Plant Mitochondrial Potassium channel - ATP sensitive* (PmitoK_{ATP}). Il PmitoK_{ATP} catalizza l'uniport elettroforetico del K^+ dall'esterno del mitocondrio verso la matrice, è inibito da ATP e attivato da specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), (Pastore et al., 1999) (fig. 1). Anche in altre specie vegetali è stata dimostrata l'esistenza di canali mitocondriali del potassio che presentano caratteristiche a volte differenti dal PmitoK_{ATP} (Fratianni et al., 2001; Petrussa et al., 2001, 2008; Ruy et al., 2004; Casolo et al., 2005); questo suggerisce che sia opportuno in genere riferirsi a "canali" per il potassio nei mitocondriali vegetali piuttosto che a una singola entità molecolare (per un confronto tra i diversi canali si veda Pastore et al., 2007). In questo lavoro si farà riferimento al solo PmitoK_{ATP} di frumento duro perché di questo canale è apparsa particolarmente interessante la capacità di essere attivato in frumento duro quando la pianta è soggetta a stress abiotici (osmotico e salino in particolare, Trono et al., 2004); questo, unitamente al modo in cui il canale può profondamente interferire con la bioenergetica mitocondriale, lascia intravedere un possibile interessante target

* Dipartimento di Scienze Agroambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi di Foggia

** Centro di Ricerca Interdipartimentale BIOAGROMED, Università degli Studi di Foggia

*** Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

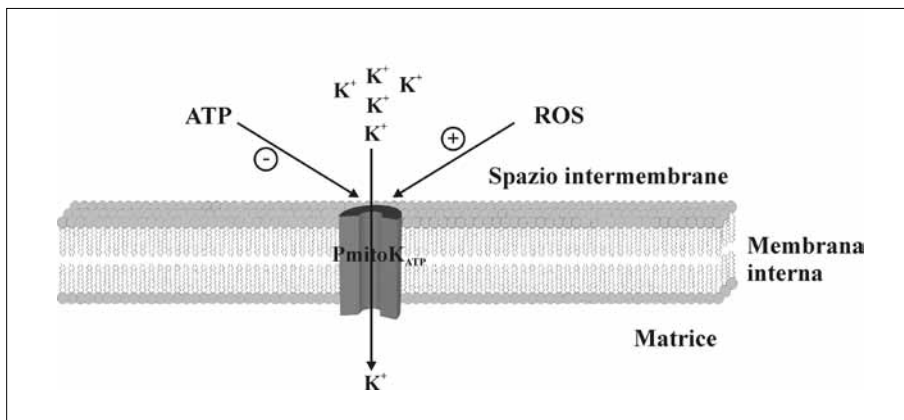


Fig. 1 *Trasporto vettoriale dello ione potassio da parte del canale mitocondriale del K^+ ($PmitoK_{ATP}$) in frumento duro. Sono indicati i compartimenti mitocondriali implicati e la modulazione da ROS e ATP. Per la spiegazione si veda il testo*

molecolare sul quale poter intervenire per aumentare la capacità del frumento duro di resistere ad alcuni stress.

In che modo l'attività del canale può essere connessa alla resistenza agli stress a livello di mitocondrio/cellula/pianta? La risposta a questa domanda passa attraverso i meccanismi di produzione di ROS, altamente reattivi, che portano a uno stress ossidativo, e quindi a un danno cellulare, quando sono prodotte in quantità elevata, come tipicamente avviene in condizioni di stress ambientale (Alsher et al., 1997).

IL NESSO TRA PRODUZIONE DI ROS, STRESS AMBIENTALI E PMITOKATP

I ROS vengono prodotti fisiologicamente dalla cellula durante il normale metabolismo aerobio. I mitocondri sono secondi solo ai cloroplasti in quanto a produzione di ROS e rimangono i principali produttori nei tessuti eziolati. In figura 2 è mostrato in che modo i mitocondri vegetali generano ROS; deve essere notato che il meccanismo è analogo anche per i mitocondri animali, ma date le elevate concentrazioni di ossigeno nelle cellule vegetali, il fenomeno è, in queste, molto più accentuato. Nella figura 2 è schematizzata la membrana interna di un mitocondrio vegetale. Come si può vedere, oltre ai complessi I-IV, i mitocondri vegetali possiedono quattro NAD(P)H deidrogenasi rotenone insensibili, due localizzate sul lato esterno NAD(P)H DH_{ext} e due sul lato interno NAD(P)H DH_{int} della membrana mitocondriale in-

terna; due sono specifiche per il NADH e due per il NADPH. È presente, inoltre, l'ossidasi alternativa (*Alternative Oxidase*, AOX).

Nella figura, il flusso degli equivalenti di riduzione attraverso i complessi della catena respiratoria è indicato unitamente all'espulsione di protoni nello spazio intermembrane da parte dei complessi I, UQ/III e IV. Si genera, così, un gradiente protonico elettrochimico trans membrana, o forza proton motrice ($\Delta\mu_{H^+}/ZF$) che consiste di due componenti: il gradiente elettrico ($\Delta\Psi$), che nei mitocondri vegetali è la principale componente (Douce et al., 1987), e il gradiente protonico (ΔpH). Il rientro dei protoni attraverso l'ATPasi (fig. 2A) porta alla sintesi di ATP. In queste condizioni si assiste anche a una produzione basale di ROS sotto forma di anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) da parte del complesso I e del UQ/complesso III. A questo livello, infatti, singoli elettroni sfuggono da alcuni particolari trasportatori della catena respiratoria, che realizzano così delle cessioni mono elettroniche direttamente all'ossigeno molecolare. Si ritiene che il citocromo c possa anch'esso generare ROS sotto forma di ossigeno singoletto (1O_2).

In condizioni di stress ambientale (fig. 2B) la forza proton motrice non viene adeguatamente utilizzata dal mitocondrio. Per esempio gli stress iperosmotici causano una diminuzione della velocità sintesi di ATP in mitocondri di frumento duro (Flagella et al., 2006 e referenze all'interno). Ciò determina un aumento del $\Delta\Psi$ associato a un eccessivo livello di riduzione dei trasportatori di elettroni, che si traduce in un aumento del processo di autossidazione con l'ossigeno molecolare descritto in precedenza, con conseguente formazione di $O_2^{\cdot-}$ su larga scala. In mitocondri di frumento duro purificati da plantule sottoposte a stress osmotico o salino è stato misurato un aumento di almeno due volte della produzione di $O_2^{\cdot-}$ (Trono et al., 2004). Dall'azione della superossido dismutasi sull' $O_2^{\cdot-}$ deriva poi l'acqua ossigenata (H_2O_2) e da questa, mediante la reazione di Fenton, il radicale ossidrilico ($\cdot OH$), specie fortemente ossidante e reattiva. Questi sono i ROS principalmente responsabili dell'instaurarsi dello stress di tipo ossidativo a livello cellulare.

L'eccesso di ROS è estremamente pericoloso per la cellula a causa dei pesanti danni che questi possono arrecare a macromolecole biologicamente importanti come lipidi, acidi nucleici e proteine. Per contrastare l'azione negativa dei ROS, i mitocondri vegetali possono mettere in atto diversi meccanismi di difesa. Oltre ai sistemi enzimatici di detossificazione dei ROS e di riparazione delle molecole modificate (Møller, 2001), i mitocondri possiedono i cosiddetti sistemi di dissipazione dell'energia, che rappresentano la prima linea di difesa contro i ROS perché evitano la loro formazione. Si tratta di proteine localizzate a livello della membrana mitocondriale interna:

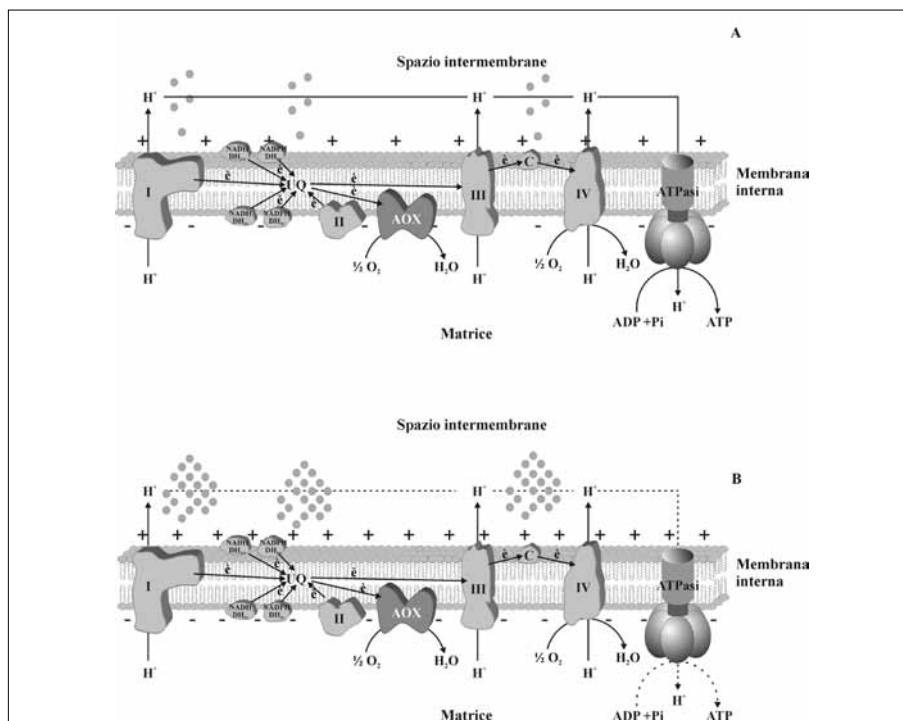


Fig. 2 Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di mitocondri vegetali in condizioni basali (A) e in condizioni di stress ambientale (B). Abbreviazioni: UQ, ubiquinone; C, citocromo c; e, elettroni o equivalenti di riduzione. Per la spiegazione si veda il testo

l'AOX (Meeuse, 1975; Møller, 2001 e referenze all'interno), la proteina di disaccoppiamento (*Plant Uncoupling Protein*, PUCP) (Vercesi et al., 1995) e, ora sappiamo, anche il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$

Il funzionamento di AOX e PUCP, sebbene con meccanismi differenti e in gran parte noti (Møller, 2001) determina un abbassamento del $\Delta\Psi$ e, conseguentemente, della produzione di ROS. In accordo con questo esiste una vasta letteratura che associa un'aumentata attività della AOX e della PUCP con l'aumento della resistenza agli stress ambientali (Pastore et al., 2007 e referenze all'interno); prime evidenze in questo senso sono disponibili anche per il frumento duro (Pastore et al., 2001; Trono et al., 2006).

Anche il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ riesce ad abbattere il $\Delta\Psi$ e controllare la produzione mitocondriale di ROS (Pastore et al., 1999; Trono et al., 2004). In figura 3 è illustrato il meccanismo alla base di questo fenomeno. È noto che i mitocondri vegetali possiedono un antiporter H^+/K^+ , particolarmente attivo (Diolez e Moreau, 1985), pertanto la cooperazione tra il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ e lo scambiatore

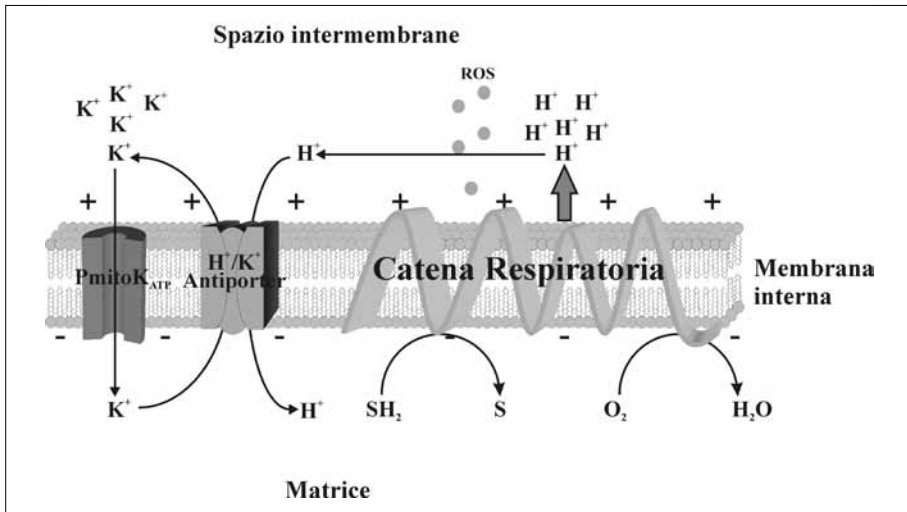


Fig. 3 *Ciclo del potassio e controllo dei ROS in mitocondri vegetali. Abbreviazioni: SH₂, substrati ridotti; S, substrati ossidati. Per la spiegazione si veda il testo*

può dare origine a un ciclo del K⁺ che, consentendo il rientro degli H⁺ nella matrice, è in grado di disaccoppiare i mitocondri. Se nei mitocondri animali la bassa attività del ciclo del K⁺ rende l'entità di questo disaccoppiamento trascurabile (Garlid e Paucek, 2003), nei mitocondri di frumento duro il ciclo del K⁺ è così attivo da poter abbattere completamente il $\Delta\Psi$ (Pastore et al., 1999).

Quindi il canale è attivato da ROS come riportato inizialmente (fig. 1), ma è anche in grado di controllare la produzione di ROS, con una inibizione rapida e molto efficace (fino a venti volte, dati non pubblicati).

Questi risultati sono in accordo con l'ipotetico meccanismo di attivazione del PmitoK_{ATP} riportato nella figura 4. In condizioni controllo l'inibizione da parte dell'ATP prevale sull'attivazione da ROS impedendo al canale di funzionare (fig. 4A). In condizioni di stress, invece, l'aumento della produzione di ROS (Trono et al., 2004) e la diminuzione della sintesi di ATP (Flagella et al., 2006) porta a un cambiamento nel bilanciamento dei modulatori; i ROS, quindi attivano il PmitoK_{ATP} che, di conseguenza, dissipa il $\Delta\Psi$ portando a una riduzione della produzione mitocondriale di ROS su larga scala attraverso un meccanismo a *feed back* (fig. 4B).

È ragionevole pensare, quindi, che il PmitoK_{ATP} che è rapidamente attivato dai ROS, possa servire come meccanismo di difesa della cellula/pianta contro gli stress. Questa ipotesi è stata dimostrata in cellule di patata in coltura (Fratianni et al., 2001) e, come già riportato, in plantule eziolate di frumento duro sottoposte a stress iperosmotico (Trono et al., 2004).

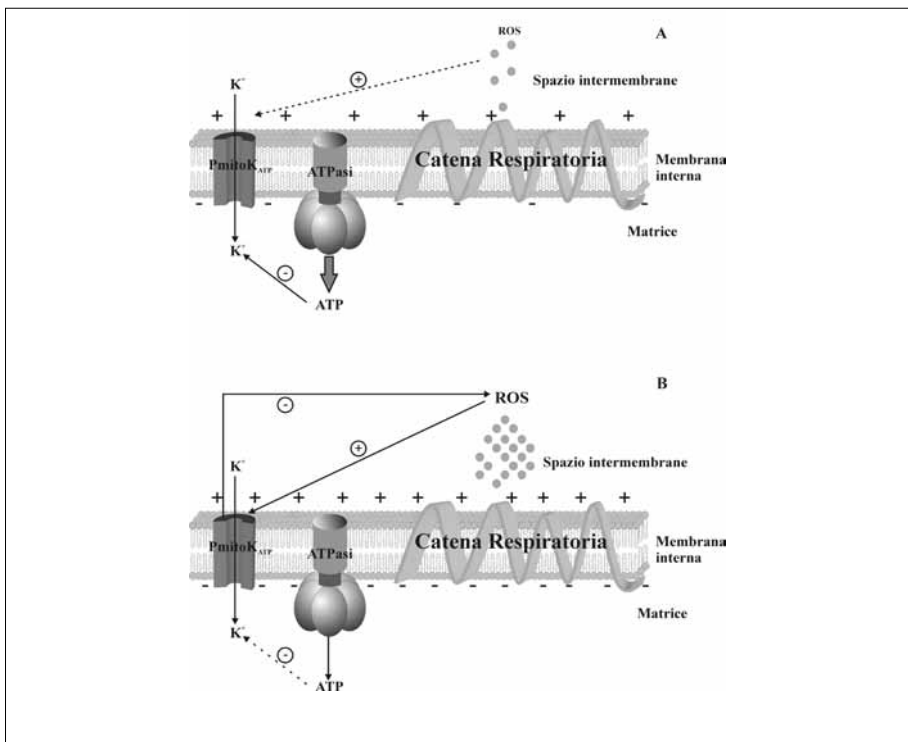


Fig. 4 Meccanismo di attivazione del $PmitoK_{ATP}$ in mitocondri di plantule eziolate di frumento duro basato sulla modulazione da ROS e ATP. Per la spiegazione si veda il testo

È interessante notare che in condizioni di stress severo, che causano danni significativi sia all'integrità sia alla funzionalità dei mitocondri (Trono et al., 2004; Flagella et al., 2006), il $PmitoK_{ATP}$ risulta ancora più attivato piuttosto che inibito. Questo dato suggerisce che la proteina può resistere in condizioni di stress elevato e che risulta coinvolta nella risposta prolungata allo stress.

LE POSSIBILI “CONTROINDICAZIONI” BIOENERGETICHE - EFFETTO DEL CANALE SUI TRASPORTI MITOCONDRIALI E SULLA SINTESI DI ATP

Appare evidente che l'abbattimento del $\Delta\Psi$ ottenuto mediante attivazione del $PmitoK_{ATP}$ è utile a contrastare il danno ossidativo causato dai ROS, ma può fortemente interferire con gli altri processi mitocondriali dipendenti dal $\Delta\Psi$ stesso, tra cui il trasporto transmembrana di metaboliti (anioni) rilevanti

per il metabolismo del mitocondrio e la sintesi di ATP mediante il processo di fosforilazione ossidativa. È legittimo, pertanto, chiedersi se il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ non aiuti la cellula per un verso, ma al contempo non la danneggi rendendo inutilizzabili i mitocondri per due loro funzioni fondamentali. È indispensabile dare risposta a questa domanda prima di ipotizzare ogni possibile risvolto applicativo degli studi sul $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ per esempio, prima di ipotizzare una strategia di miglioramento genetico, convenzionale o non, teso a ottenere un aumento dell'attività del canale.

Le nostre conoscenze più recenti, però, incoraggiano fortemente in questo senso. Relativamente ai trasporti a livello della membrana mitocondriale interna, è stata riportata l'esistenza, in frumento duro, di un canale degli anioni (*Plant Inner Membrane Anion Channel*, PIMAC) (Laus et al., 2008). Questo canale è inibito da ATP e da un elevato $\Delta\Psi$ e svolge un ruolo fondamentale nel mediare il flusso di anioni metabolicamente rilevanti tra mitocondrio e citosol.

L'inibizione da ATP e la modulazione da potenziale elettrico dell'attività del PIMAC suggeriscono che il PIMAC possa funzionare essenzialmente quando il mitocondrio presenta un basso $\Delta\Psi$. In condizioni di elevato $\Delta\Psi$,

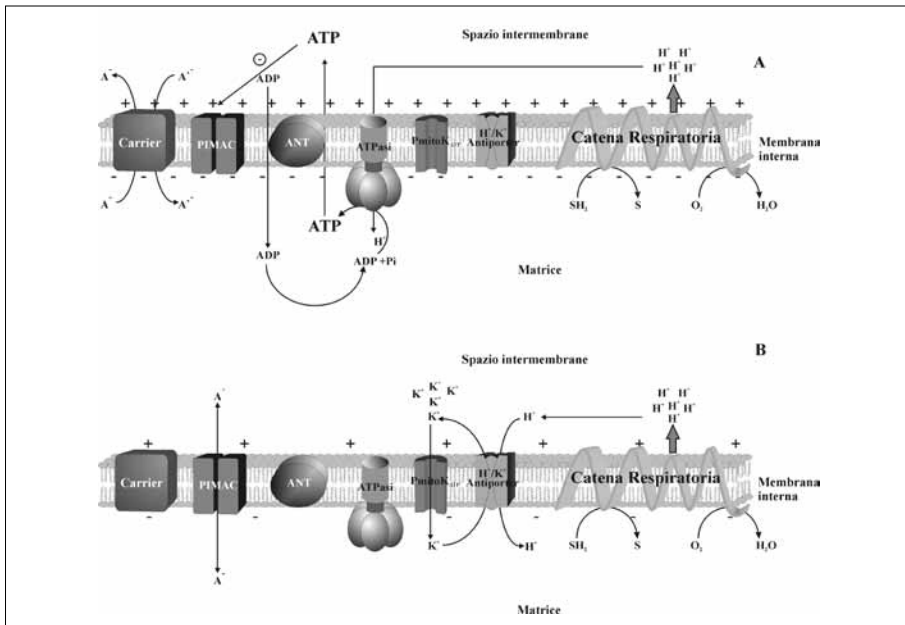


Fig. 5 Meccanismo di trasporto degli anioni in condizioni normali (A) e di de-energizzazione (B) in mitocondri di frumento duro. Abbreviazioni: SH₂, substrati ridotti; S, substrati ossidati; ANT, scambiatore ATP/ADP. Per la spiegazione si veda il testo

infatti, è elevata anche la sintesi di ATP per cui, mentre il $\Delta\Psi$ ostacola l'ingresso di anioni attraverso il PIMAC, l'ATP può inibirne l'uscita (fig. 5A). Poiché il PIMAC trasporta in modo molto efficiente fosfato, dicarbossilati, chetodicarbossilati e tricarbossilati, ci si deve attendere che esso possa rappresentare il meccanismo privilegiato di trasporto di questi anioni in condizioni in cui il mitocondrio è depolarizzato dall'azione del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ (fig. 5B).

Relativamente all'effetto dell'attività del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ sulla sintesi di ATP mediante il processo di fosforilazione ossidativa è stato valutato l'effetto del KCl sul $\Delta\Psi$ e sulla sintesi di ATP in mitocondri di frumento duro che ossidano succinato. Inaspettatamente, i mitocondri di frumento duro trattati con KCl, nonostante mostrassero un bassissimo valore di $\Delta\Psi$, mostravano un buon controllo respiratorio e un buon rapporto ADP/O (due parametri dell'efficienza del processo di fosforilazione ossidativa) e sintetizzavano ATP alla stessa velocità dei mitocondri controllo (lavoro in preparazione). Questo risultato è unico in letteratura. Alcuni esperimenti suggeriscono l'esistenza di una forza proton-motrice latente, non direttamente misurabile in maniera classica, generata dalla proprietà del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ di essere inibito da ATP. In pratica, l'inibizione del canale eserciterebbe un freno tale da consentire che una quota di protoni non sia utilizzata dal ciclo del potassio descritto in figura 3, ma resti a disposizione dell'ATP sintasi per la sintesi dell'ATP.

IPOTESI SULLA NATURA MOLECOLARE DEL $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$

Alla luce di quanto riportato, l'abbattimento della forza proton-motrice indotto dal $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ è in grado di controllare l'extra-produzione di ROS da parte dei mitocondri soggetti a stress, così proteggendo la cellula, senza al contempo compromettere, almeno inizialmente, la bioenergetica cellulare. Questa indicazione rende il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ estremamente interessante per il miglioramento genetico del frumento duro per resistenza agli stress ambientali; probabilmente è più interessante dell'AOX e della PUCP, che sono anche in grado di prevenire la sovra-produzione di ROS, ma nel far questo possono incidere anche fortemente sulla resa energetica del mitocondrio inibendo la sintesi di ATP.

Sfortunatamente a oggi non è ancora nota la natura molecolare del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ e addirittura non è nota neanche quella della sua controparte animale, umana in particolare, sulla quale pure esiste una importante letteratura per il suo coinvolgimento nei meccanismi di difesa, a livello del cuore e del cervello,

dai danni da riperfusione post ischemica. A oggi sono disponibili solo ipotesi e la proteina resta particolarmente elusiva.

POSSIBILI STRUTTURE MOLECOLARI DEL CANALE MITOCONDRIALE DEL K^+ IN MAMMIFERI E VEGETALI

La presenza di un canale del K^+ in mitocondri di mammifero è nota dal 1991 (Inoue et al., 1991), ma, al momento, le informazioni sulla sua struttura e identità molecolare sono piuttosto controverse. Tre diversi gruppi sono giunti a tre diverse proposte. Il gruppo di Garlid ha purificato da fegato di ratto, cuore di bue (Paucek et al., 1992) e cervello di ratto (Bajgar et al., 2001) un canale mitocondriale del K^+ definito $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, che, al pari del K_{ATP} del pla-

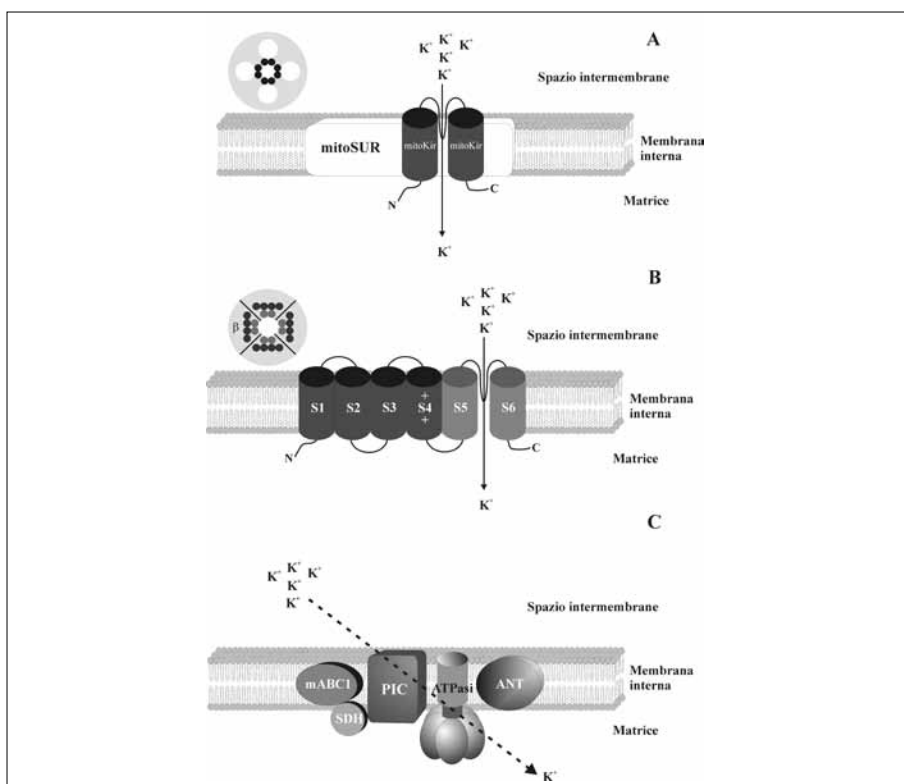


Fig. 6 Strutture proposte per il/i canale/i mitocondriale/i del K^+ nei mammiferi. Abbreviazioni: S, segmenti transmembrana; mABC1; proteina mitocondriale 1 con cassetta di legame per l'ATP; PIC; carrier del fosfato; ANT; carrier degli adenin nucleotidi, SDH, succinato deidrogenasi. Per la spiegazione si veda il testo

smalemma, sembra essere costituito da un complesso eteromultimerico di 4 subunità di 55 kDa del tipo Kir (2TMD/1P, cioè 2 domini transmembrana e 1 Poro) (mitoKir) e da 4 recettori per la sulfonilurea (SUR) di 63 kDa (mitoSUR) (fig. 6A, Grover e Garlid, 2000; Mironova et al., 2004; Carreira et al., 2005). Szabò e collaboratori, invece, hanno dimostrato nella membrana mitocondriale interna di linfociti T (Szabò et al., 2005) e di una linea cellulare umana di tumore del colon (De Marchi et al., 2009) la localizzazione di un canale del tipo Kv e K_{Ca} , rispettivamente, cioè di canali del tipo 6TMD/1P (fig. 6B), da sempre ritenuto presente esclusivamente nella membrana plasmatica. Ardehali et al. (2004) hanno riportato attività di tipo mitoK_{ATP} in una frazione della membrana mitocondriale interna, altamente purificata e ricostituita in liposomi, contenente 5 differenti proteine mitocondriali [la proteina mitocondriale 1 con cassetta di legame per l'ATP (mABC1), il carrier del fosfato (PIC), il carrier degli adenin nucleotidi (ANT), l'ATPasi e la succinato deidrogenasi (SDH)], ma, apparentemente, non contenente nessuna subunità di tipo Kir (fig. 6C).

Le tre diverse situazioni descritte non sono necessariamente in antitesi tra di loro e potrebbero essere tutte corrette, descrivendo così una situazione in cui diverse proteine, presenti contemporaneamente, sono attive nel trasporto del K⁺.

A oggi quasi nulla è noto riguardo all'identità molecolare del/i canale/i del K⁺ nei mitocondri vegetali: in una comunicazione a congresso è stata riportata una prima purificazione di un canale tipo mitoK_{ATP} da patata (Paucek et al., 2002) con subunità di tipo Kir e subunità regolatrici di tipo SUR, ma la comunicazione non è stata seguita da una pubblicazione vera e propria. Deve però essere sottolineato che nel genoma di *Arabidopsis* e riso non esistono geni per veri e propri canali di tipo Kir, ma al limite di tipo Kir-like. Mediante studi di proteomica, inoltre, in mitocondri di riso è stata suggerita l'esistenza di una subunità regolatrice di tipo β (Tanaka et al., 2004), che suggerirebbe la possibile esistenza di canali tipo Kv. Le uniche informazioni nei vegetali riguardano al momento canali del potassio non mitocondriali, in parte riassunte nel paragrafo che segue.

CANALI DEL K⁺ NELLE PIANTE

Nelle piante l'identificazione di geni per i canali del K⁺ è ancora all'inizio; al momento il maggior numero di informazioni riguarda *Arabidopsis thaliana*. I canali del K⁺ individuati in questa specie appartengono a tre distinte famiglie:

quella dei canali 6TMD/1P di tipo shaker, quella dei canali 4TMD/2P (Tandem-Pore K⁺ Channel, TPK) e quella dei canali Kir-like, rappresentati dal solo KCO3 (Mäser et al., 2001; Lebaudy et al., 2007). La prima famiglia, che comprende nove geni omologhi dei geni Kv tipo Shaker dei mammiferi, è a sua volta suddivisa in due subfamiglie: alla prima appartengono i geni AKTs e KATs, che codificano per canali *inward rectifying*; la seconda include i geni SKOR e GORK codificanti per canali *outward rectifying*. Alla famiglia 4TMD/2P appartengono cinque geni (TPKs) che codificano per canali a due pori *outward rectifying* (Mäser et al., 2001; Chérel, 2004; Lebaudy et al., 2007). In carota è stato isolato e caratterizzato il primo canale del K⁺ (KDC1) espresso nelle fasi precoci dell'embriogenesi somatica (Downey et al., 2000; Costa et al., 2004); successivamente è stato identificato un canale del K⁺ (DKT1) espresso in fasi tardive del processo embriogenico (Formentin et al., 2004).

Al pari dei mammiferi, anche nelle piante i canali del K⁺ mostrano un'elevata diversità funzionale, che deriva dall'esistenza di numerosi geni, dalla possibilità di assemblare subunità identiche o correlate, dall'associazione con subunità regolatrici, da modificazioni post-traduzionali, da differenti livelli di espressione dei geni e da espressione tessuto-specifica (Cao et al., 1995).

DALLA FUNZIONE ALLA PROTEINA — STRATEGIE PER L'IDENTIFICAZIONE DEL PMITOK_{ATP}

L'identificazione a livello molecolare del canale del potassio mitocondriale individuato in grano duro (PmitoK_{ATP}) si è basata sul confronto con il suo omologo animale. Nei mammiferi, come si è detto, è però ancora dubbia la composizione di tale canale. Una delle ipotesi è che il mitoK_{ATP} sia strutturalmente simile al K_{ATP} presente nella membrana plasmatica, un complesso costituito da due proteine: il recettore della sulfonilurea SUR (~160 kDa), un membro della famiglia di trasportatori ABC (ATP-binding cassette), e una proteina più piccola (~40 kDa), Kir6.1 o Kir6.2, appartenente alla famiglia dei canali del potassio *inward rectifying*. Quattro subunità Kir6.x si assemblano a formare un poro selettivo per il potassio, associato a quattro subunità SUR (Moreau et al., 2005). La struttura secondaria delle subunità costituenti i canali Kir6.x è costituita di due domini transmembrana (TMD) e una regione del poro (P), appartenendo così alla categoria di subunità alfa di canali del potassio 2TMD/1P.

L'analisi bioinformatica mediante Blastx (Altschul et al., 1990) sui genomi vegetali fino a oggi sequenziati non ha dato risultati: non esistono

canali simili ai Kir animali nelle piante. Questi canali, molto simili ai canali del potassio batterici, sono evidentemente stati persi nel corso dell'evoluzione. Nell'alga *Chlamydomonas reinhardtii*, infatti, è presente un membro appartenente a questa famiglia suggerendo che il gene sia stato perso nella separazione tra clorofite e spermatofite. Questo non significa che la funzione sia andata perduta, infatti, abbiamo prova dell'esistenza del PmitoK_{ATP} in molte piante (Pastore et al., 1999, 2007). Molto probabilmente un'altra proteina o un complesso proteico sopperiscono alla stessa funzione. Questa nuova proteina potrebbe o derivare dalla fusione del dominio funzionale per il trasporto del potassio con altri domini che negli animali costituiscono le subunità regolatrici del canale, oppure essere una proteina diversa, ma

TIPO DI CANALE	MODELLO GENICO AL TAIR ^a	NOME DELLA PROTEINA	LOCALIZZAZIONE* (BIOINFORMATICA)	DIMENSIONE (AA)	BIBLIOGRAFIA
Shaker inward-rectifier (1P/6TM)	At5g46240	KAT1	PM (secr>mito)	677	Anderson et al., 1992; Szyroki et al., 2001; Mura et al., 2004
	At4g18290	KAT2	PM (mito=secr)	697	Pilot et al., 2001
	At4g32650.1	KAT3	PM** (chl>mito>secr)	662	Reintanz et al., 2002;
	At4g32650.2***		idem	597	Duby et al., 2008
	At4g22200	AKT2/3	PM (secr)	802	Latz et al., 2007
	At2g26650	AKT1	PM (secr>chl=mito)	857	Sentenac et al., 1992;
	At4g32500	AKT5	(secr)	880	Geiger et al., 2009
	At2g25600.1	AKT6/SPIK	PM (secr)	888	- Mouline et al., 2002
Shaker outward-rectifier (6TMD/1P)	At3g02850	SKOR	PM (secr)	828	Gaymard et al., 1998
	At5g37500	GORK	PM (mito=secr)	820	Ache et al., 2000; Hosy et al., 2003
Tandem-pore (4TMD/2P)	At5g55630	TPK1	T (chl>>secr)	363	Czempinski et al., 2001; Gobert et al., 2007
	At5g46370	TPK2	(chl>secr)	443	Voelker et al., 2006
	At4g18160	TPK3	(chl>secr)	436	Voelker et al., 2006
	At1g02510	TPK4	PM (secr>>chl)	284	Becker et al., 2004
	At4g01840	TPK5	(chloroplast)	408	Voelker et al., 2006
	At5g46360	KCO3	T (secr=mito>chl)	260	Voelker et al., 2006

^awww.arabidopsis.org; *dimostrata sperimentalmente; **è una subunità regolatrice che è in grado di localizzarsi in membrana solo con determinate altre subunità (ad es. KAT1 e AKT1); ***forma alternativa del trascritto.

Tab. 1 Lista di canali del potassio di *Arabidopsis thaliana*

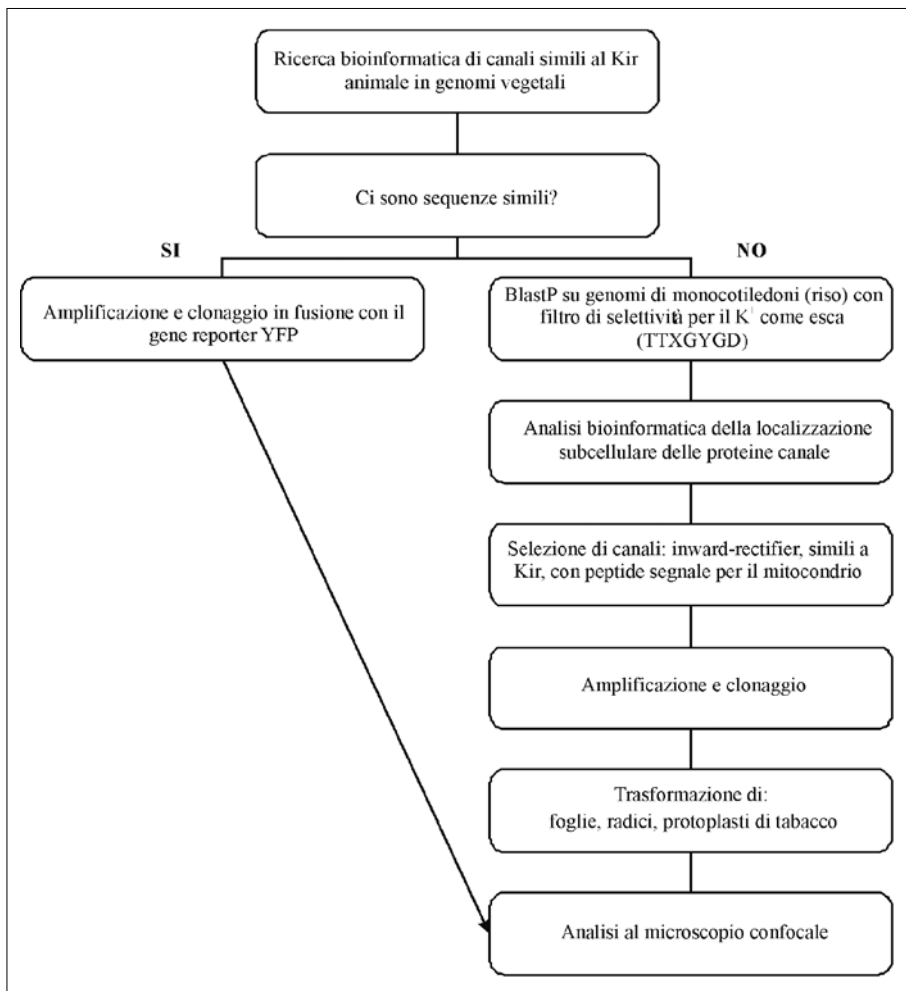
con funzione simile. Poiché non conosciamo la risposta, abbiamo pensato di individuare tutti i putativi canali del potassio presenti nelle monocotiledoni. In *Triticum aestivum* è stato studiato un solo canale TaAKT1, in mais invece ne sono stati studiati quattro, mentre in riso solo due. Tutti questi canali sono del tipo Shaker *inward rectifying* (6TMD/1P), voltaggio-dipendenti e altamente selettivi per il potassio, ma con localizzazione a livello della membrana plasmatica. Nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, come si è detto, sono stati individuati nove geni codificanti per canali al potassio del tipo Shaker, sei geni codificanti canali tandem-pore (4TMD/2P) (vedi tab. 1) in più sono stati individuati almeno venti geni codificanti per canali debolmente selettivi per il potassio del tipo *Cyclic Nucleotide Gated Channels*, CNGC. Questi ultimi sono stati poco considerati in questa analisi in quanto non altamente selettivi.

Nonostante gli studi su questi canali siano cominciati più di un decennio fa, nessuno finora è stato localizzato a livello del mitocondrio.

I canali della famiglia tandem-pore sono i più simili strutturalmente ai canali Kir animali in quanto presentano un dominio ripetuto in tandem costituito da due regioni transmembrana e una regione del poro, i due canali attualmente caratterizzati (TPK1 e TPK4) non mostrano voltaggio-dipendenza e sono localizzati nel tonoplasto e nella membrana plasmatica rispettivamente.

STRATEGIA DI ISOLAMENTO DEL GENE/PROTEINA BASATA SU GENI CANDIDATI

A causa degli scarsi dati presenti nei database sui canali di monocotiledoni, abbiamo pensato di sfruttare il genoma sequenziato di riso per cercare tutti i canali selettivi per il potassio e studiarne la localizzazione subcellulare in un sistema eterologo come il tabacco (vedi schema 1). L'analisi è stata effettuata mediante BlastP (Altschul et al., 1990), utilizzando la sequenza consenso del filtro di selettività per il potassio (TTXGYGD) come "esca". Sono state così identificate alcune sequenze che codificano per putativi canali del potassio (tab. 2). Quindi, utilizzando appositi programmi disponibili in rete per la predizione della localizzazione subcellulare, quali Predotar e Mitopred, è stato individuato un canale Shaker-like *inward rectifying* (Aramemnon Os01g45990, GenBank AK120308) con un putativo peptide segnale per il mitocondrio (punteggio 22,3 contro 5,3 per la predizione per la via secretoria). Dal momento che non sempre è necessario un segnale per traghettare una proteina al mitocondrio, si è deciso di estendere comunque lo studio



Schema 1 *Schema della strategia di isolamento di canali mitocondriali in riso*

della localizzazione subcellulare a tutti i canali isolati. Come si può vedere in tabella 2 sono stati scartati alcuni canali, o perché la sequenza sembrava incompleta, o perché *outward rectifying* (canali Shaker presenti solo nelle piante). È stato invece tenuto in considerazione un canale del tipo CNGC in quanto presentava 5 varianti di *splicing* e una di queste aveva una predizione di localizzazione mitocondriale (punteggio 4,5 contro 0,0 per via secretoria e cloroplasto) e una dimensione paragonabile al Kir animale (ca. 56,4 kDa), rispetto ad alcuni Shaker, ben più grandi.

TIPO DI CANALE	CDNA ID	ARAMEMNON ^a ID	ARABIDOPSIS MIGLIOR RISULTATO	LOCALIZZAZIONE (SOLO BIOINFORMATICA)	DIMENSIONE (AA)	BIBLIOGRAFIA
Shaker inward-rectifier (1P/6TM)	AK065938	Os01g11250	KAT1-like	weak secr	568	-
	AK100739	Os01g55200	KAT1-like	weak secr	502	Obata et al., 2007
	AK120308	Os01g45990	AKT1-like	mito	935	Fuchs et al., 2005
	AK061594	Os05g35410	AKT2/3-like	weak secr	703	-
	AK100808	Os02g14840	KAT1-like	secr	718	-
		Os06g14310	KAT3/AtKC1-like	mito/secr	591	-
		Os04g02720	KAT3-like	mito/secr	368	-
		Os01g52070	KAT3-like	weak mito/secr	593	-
Tandem-pore (2P/4TM)		Os07g01810	TPK1-like	weak mito/secr	349	-
		Os03g54100	TPK1-like	weak secr	347	-
CNGC		Os09g38580	CNGC-like	weak mito splicing n.3 (450aa)	5 splicing variants	-
Canali non considerati		Os04g36740	SKOR-like	n.d.	722	-
		Os06g14030	SKOR-like	n.d.	858	-
		Os07g07910	AKT5-like	chl	891	-
		Os03g28120	KAT1-like	incompleto	156	-

^aAramemnon.botanik.uni-koeln.de

Tab. 2 Lista di canali del potassio di *Oryza sativa* (cv Japonica)

Le sequenze codificanti così selezionate sono state quindi sottoposte ad amplificazione con specifici oligonucleotidi sintetici per poter essere successivamente inserite nel vettore binario pGreen0029 (Hellens et al., 2000) in fusione con il gene reporter YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). La fusione è stata fatta al C-terminale della proteina in esame per non mascherare l'eventuale peptide segnale N-terminale.

- Una volta ottenuti, i costrutti sono stati amplificati in *E. coli* e in seguito:
- purificati e utilizzati per la trasformazione transiente di protoplasti (PPS) di mesofillo di tabacco mediata da polietilenglicole (PEG) 4000. I PPS trasformati sono stati osservati al microscopio confocale dopo 16-24 ore di incubazione a 18-23°C al buio (Hosy et al., 2005).
 - inseriti nel ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 ingegnerizzato con il plasmide helper pSoup (Vain et al., 2003), che permette il trasferimento del T-DNA contenuto nel vettore pGreen, per il protocollo di agroinfiltrazione. Foglie ottenute da piante dopo quattro settimane dalla semina sono state trasformate utilizzando una concentrazione batterica di

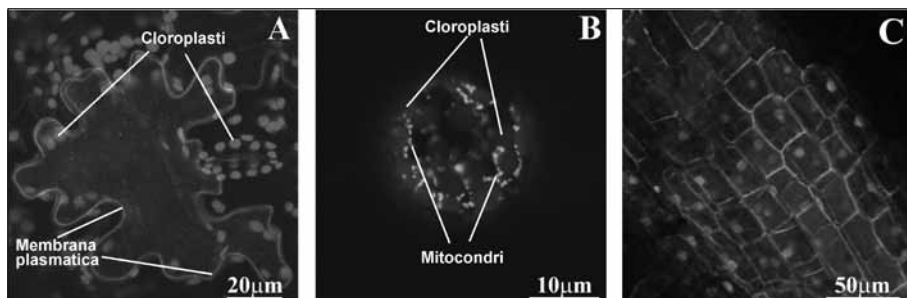


Fig. 7 Osservazione al microscopio confocale dei marcatori di controllo. A) la fluorescenza è localizzata a livello della membrana plasmatica di una cellula epidermica di una foglia di tabacco agroinfiltrata, è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti; B) la fluorescenza è localizzata a livello dei mitocondri in protoplasti di mesofillo di tabacco trasformati transientemente; anche in questo caso è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti; C) la fluorescenza è diffusa nel citoplasma e nel nucleoplasma di cellule di radice trasformata. Per la spiegazione si veda il testo

$OD_{600}=1$. Dal secondo giorno dopo l'agroinfiltrazione i campioni sono stati osservati al microscopio confocale (Zottini et al., 2008).

- Inseriti in *Agrobacterium rhizogenes* in co-trasformazione con il plasmide helper pSoup. Espianti fogliari di piante di tabacco di quattro settimane sono stati usati per la trasformazione e per l'ottenimento di radici transgeniche. Il protocollo prevedeva in questo caso la co-coltivazione degli espianti con il batterio ingegnerizzato e la successiva crescita in terreno selettivo fino all'ottenimento delle radici (Chen et al., 2007).

Per la messa a punto del protocollo sono stati utilizzati costrutti di controllo disegnati nel vettore pGreen0029 (Hellens et al., 2000) ed esprimenti: i) la proteina di fusione KDC2::YFP (Formentin et al., 2006), come marcatore per la membrana plasmatica (fig. 7A); ii) la proteina YFP con il peptide segnale N-terminale della subunità beta della ATPase mitocondriale, come marcatore del mitocondrio (fig. 7B); iii) la forma solubile della YFP per marcare il citoplasma (fig. 7C).

PRIMI ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DEI PRODOTTI GENICI ANALIZZATI

Risultati preliminari hanno indicato come il sistema migliore per lo studio siano le foglie di tabacco agroinfiltrate, dove infatti è stata ottenuta un'ottima efficienza di trasformazione. Mentre i protoplasti si sono rivelati poco infor-

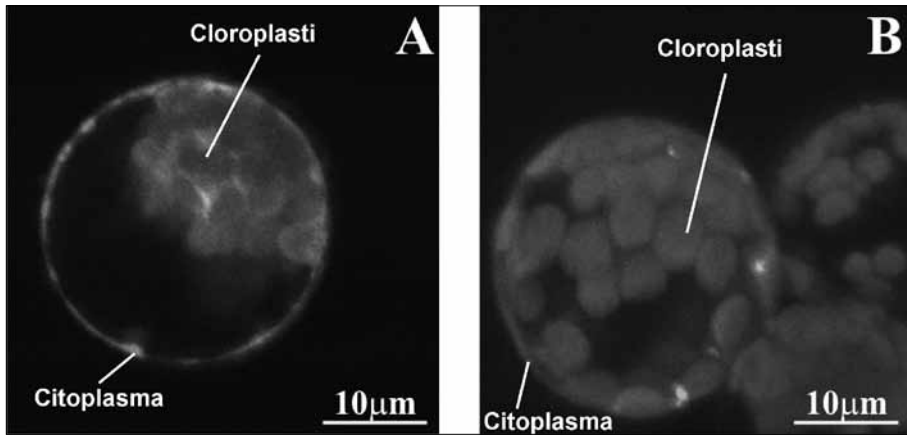


Fig. 8 Localizzazione subcellulare della subunità beta di riso in protoplasti di mesofillo di tabacco (PPS). A) PPS trasformati esprimenti la proteina di fusione KOB1::GFP. La fluorescenza è localizzata intorno ai cloroplasti e alla periferia della cellula. B) PPS trasformati esprimenti la proteina di fusione KOB1::GFP e il canale Shaker-like inward rectifying AKT1 di *Arabidopsis*. La fluorescenza è localizzata sempre nel citoplasma. In entrambe le figure è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti. Per la spiegazione si veda il testo

mativi in quanto l'efficienza di trasformazione non superava il 20% e l'intensità di fluorescenza era molto variabile, dipendendo dal numero di copie di plasmide inseritesi in ogni cellula durante la trasformazione. Nelle cellule epidermiche della pagina inferiore delle foglie, invece, la fluorescenza, dopo qualche giorno di incubazione, è più uniforme. In questa situazione è più facile confermare il risultato di localizzazione ed escludere falsi risultati dovuti all'espressione troppo forte del transgene.

Una volta messi a punto i protocolli, è stato possibile iniziare lo studio seriale dei canali, a partire da quelli di dimensioni più piccole e facili da clonare, quali AK109604 e AK069303, due rappresentanti della famiglia tandem-pore, e la proteina KOB1.

Quest'ultima è una proteina di 36kDa, nota come subunità beta dei canali al potassio, identificata in un'analisi del proteoma di mitocondrio di riso (Fang et al., 1998; Tanaka et al., 2004). Queste subunità sono poco studiate nelle piante, mentre negli animali si sa che regolano i canali del potassio legandosi alle subunità alfa che li compongono e inoltre possiedono un'attività ossidoreduttasica.

Abbiamo verificato la localizzazione subcellulare di questa proteina in PPS di tabacco. Per fare ciò, la proteina è stata fusa al C-terminale con la proteina fluorescente GFP nel vettore pUC-GFP utile per l'espressione transiente del

transgene. Purtroppo non è stata osservata la marcatura a livello dei mitocondri, ma nel citoplasma (fig. 8A). Per verificare ulteriormente la localizzazione, PPS sono stati co-trasformati con un costrutto per l'espressione del canale Shaker AtAKT1 di *A. thaliana*, noto per essere un partner della subunità beta in Arabidopsis. Anche in questo caso la fluorescenza è stata osservata nel citoplasma (fig. 8B). Questo risultato è in contrasto con quanto pubblicato in precedenza (Tanaka et al., 2004), però non è del tutto inatteso in quanto spesso gli esperimenti di proteomica danno falsi positivi dovuti a contaminazioni durante la preparazione dei campioni.

In merito ai due canali AK109604 e AK069303, risultati preliminari suggeriscono una localizzazione in tonoplasto e reticolo endoplasmatico, rispettivamente, con abbondante presenza di entrambi i canali anche in sistemi di vescicole intracellulari. Per definire in maniera conclusiva questi risultati sono, però, ancora necessari ulteriori approfonditi esperimenti di co-localizzazione con marcatori di compartimenti intracellulari.

PROSPETTIVE DELLA RICERCA

Nel prossimo futuro sarà necessario continuare lo studio seriale dei canali di riso con saggi di espressione eterologa in tabacco. Questo studio verrà affiancato dall'analisi fenotipica di mutanti per gli stessi canali, per vedere se mutazioni in tali geni possano portare alla modificazione dell'attività del PmitoK_{ATP} o della funzionalità mitocondriale. Questo tipo di studio, applicato anche a quei canali che non avessero localizzazione mitocondriale, permetterà di definire la funzione di geni non ancora studiati in riso. Per confermare la localizzazione subcellulare, inoltre, i costrutti verranno utilizzati in saggi di espressione omologa mediante trasformazione di germogli di riso secondo un protocollo che è attualmente in fase di messa a punto.

Deve essere sottolineato che l'interesse ultimo è quello di arrivare all'identificazione del PmitoK_{ATP} di frumento duro, per cui l'utilizzo della "genetica" di specie prossime a quella di interesse serve come strumento iniziale, per acquisire conoscenze da applicare poi alla specie target. Nel contempo, dovranno anche continuare le ricerche bioenergetiche e funzionali in frumento duro, con particolare interesse all'individuazione di nuove vie di regolazione del PmitoK_{ATP} oltre a quella "ATP/ROS" riportata in figura 4. In questo senso, recentissime osservazioni suggeriscono l'esistenza di una regolazione da parte di acidi grassi liberi prodotti da una fosfolipasi mitocondriale attivata dallo stress (dati non pubblicati); si apre così un nuovo capitolo, che potrebbe

portare sviluppi molto interessanti nella ricerca sui meccanismi di resistenza allo stress in frumento duro.

I risultati ottenuti e le buone prospettive di ricerca, dimostrano che nel complesso è vincente la strategia di associare, quanto più possibile strettamente, gli studi bioenergetici a quelli molecolari e così anche è vincente la strategia di finalizzare la ricerca di base a singoli e ben definiti aspetti applicativi per un'agricoltura del XXI secolo.

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo lavoro è stata possibile grazie ai finanziamenti del progetto AGROGEN "Laboratorio di GENomica per caratteri di importanza AGRonomica in frumento duro: identificazione di geni utili, analisi funzionale e selezione assistita con marcatori molecolari per lo sviluppo della filiera sementiera nazionale" del Ministero dell'Università e della Ricerca.

RIASSUNTO

Nei mitocondri vegetali di frumento duro è stata dimostrata per via funzionale l'esistenza di un canale del potassio (*Plant Mitochondrial Potassium Channel – ATP sensitive*, PmitoK_{ATP}) simile al canale animale mitoK_{ATP}. Questo canale è in grado di inibire la dannosa sovra produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno, che si verifica generalmente quando la pianta/cellula è sottoposta a uno stress ambientale. In accordo con questa proprietà, si è trovato che il PmitoK_{ATP} viene attivato quando plantule di frumento duro sono sottoposte a stress iperosmotico e si ritiene che questo canale possa rappresentare un nuovo, interessante sistema di difesa dagli stress abiotici in frumento duro. Purtroppo, non è stata ancora definita la natura molecolare del PmitoK_{ATP}. Per isolarlo e caratterizzarlo a livello molecolare sono stati considerati tutti i canali del potassio di riso che somigliassero ai canali Kir animali e tutti quelli riconosciuti utilizzando la sequenza consenso del filtro di selettività per il potassio (TTXGYGD); particolare attenzione è stata posta ai canali che presentassero anche un putativo peptide segnale mitocondriale. È stata completata una lista di undici canali che ora sono studiati sistematicamente. Per determinare la localizzazione subcellulare di questi canali, le sequenze codificanti sono state fuse al gene reporter YFP ed espresse in un sistema eterologo, il tabacco. Vengono qui riportati i primi risultati.

ABSTRACT

A potassium channel similar to animal mitoK_{ATP} was functionally demonstrated in durum wheat mitochondria (*Plant Mitochondrial Potassium Channel – ATP sensitive*, PmitoK_{ATP}), deeply affecting mitochondrial bioenergetics. This channel was found to

be able to inhibit the large-scale mitochondrial production of harmful ROS, generally occurring when the plant/cell is subjected to an environmental stress. Consistently, the channel activity was found to be increased when durum wheat seedlings were subjected to hyperosmotic stress, so the PmitoK_{ATP} may be a novel, interesting defense system in durum wheat against abiotic stress. Unfortunately, the gene/s – protein/s of the channel are unknown. To isolate this protein complex eleven rice potassium channels were selected being similar to animal Kir channels or being potassium channels on the basis of the selectivity filter TTXGYGD, with particular attention towards channels possibly putatively targeted to mitochondria. All coding sequences have been fused to YFP reporter gene and expressed in the heterologous system tobacco to find their sub-cellular localization. Here, the first results are reported.

BIBLIOGRAFIA

- ACHE P., BECKER D., IVPASTORASHIKINA N., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., HEDRICH R. (2000): *GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel*, «FEBS Letters», 486, pp. 93-98.
- ALSCHER R.G., DONAHUE J.L., CRAMER C.L. (1997): *Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells*, «Physiologia Plantarum», 100, pp. 224-233.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990): *Basic local alignment search tool*, «Journal of Molecular Biology», 215, pp. 403-410.
- ANDERSON J.A., HUPRIKAR S.S., KOCHIAN L.V., LUCAS W.J., GABER R.F. (1992): *Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 89, pp. 3736-3740.
- ARDEHALI H., CHEN Z., KO Y., MEJIA-ALVAREZ R. MARBÁN E. (2004): *Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity*, «Proceedings of the National Academy of Science of USA», 101, pp. 11880-11885.
- BAJGAR R., SEETHARAMAN S., KOWALTOWSKI A.J., GARLID K.D., PAUCEK P. (2001): *Identification and Properties of a Novel Intracellular (Mitochondrial) ATP-sensitive Potassium Channel in Brain*, «The Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 33369-33374.
- BECKER D., GEIGER D., DUNKEL M., ROLLER A., BERTL A., LATZ A., CARPANETO A., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., VOELKER C., SCHMIDT D., MUELLER-ROEBER B., CZEMPINSKI K., HEDRICH R. (2004): *AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 101, pp. 5621-5626.
- CAO Y., WARD J.M., KELLY W.B., ICHIDA A.M., GABER R.F., ANDERSON J.A., UOZUMI N., SCHROEDER J.I., CRAWFORD N.M. (1995): *Multiple Genes, Tissue Specificity, and Expression-Dependent Modulation Contribute to the Functional Diversity of Potassium Channels in Arabidopsis thaliana*, «Plant Physiology», 109, pp. 1093-1106.
- CARREIRA R.S., FACUNDO H.T.F., KOWALTOWSKI A.J. (2005): *Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion*, «Brazilian Journal of Medical and Biological Research», 38, pp. 345-352.

- CASOLO V., PETRUSSA E., KRAJÁKOVÁ J., MACRÌ F., VIANELLO A. (2005): *Involvement of the mitochondrial K^+_{ATP} channel in H_2O_2 - or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 997-1006.
- CHEN S.C., LIU H.W., LEE K.T., YAMAKAWA T. (2007): *High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of heat inducible sHSP18.2-GUS in Nicotiana tabacum*, «Plant Cell Reports», 26, pp. 29-37.
- CHÉREL I. (2004): *Regulation of K^+ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects*, «Journal of Experimental Botany», 55, pp. 337-351.
- COSTA A., CARPANETO A., VAROTTO S., FORMENTIN E., MARIN O., BARIZZA E., TERZI M., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2004): *Potassium and carrot embryogenesis: Are K^+ channels necessary for development?*, «Plant Molecular Biology», 54, pp. 837-852.
- CZEMPINSKI K., FRACHISSE J.M., MAUREL C., BARBIER-BRYGOO H., MUELLER-ROEBER B. (2002): *Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis two-pore K^+ channel KCO1*, «The Plant Journal», 29, pp. 809-820.
- DE MARCHI U., SASSI N., FIORETTI B., CATACUZZENO L., CEREGHETTI G.M., SZABÒ I., ZORATTI M. (2009): *Intermediate conductance Ca^{2+} -activated potassium channel ($K_{Ca}3.1$) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells*, «Cell Calcium», 45, pp. 509-516.
- DIOLEZ P., MOREAU F. (1985): *Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria*, «Biochimica et Biophysica Acta», 806, pp. 56-63.
- DOUCE R., BOURGUIGNON J., BROUQUISSE R., NEUBURGER M. (1987): *Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity*, «Methods in Enzymology», 148, pp. 403-415.
- DOWNEY P., SZABÒ I., IVASHIKINA N., NEGRO A., GUZZO F., ACHE P., HEDRICH R., TERZI M., LO SCHIAVO F. (2000): *KDC1, a novel carrot root hair K^+ channel: cloning characterization, and expression in mammalian cell*, «The Journal of Biological Chemistry», 275, pp. 39420-39426.
- DUBY G., HOSY E., FIZAMES C., ALCON C., COSTA A., SENTENAC H., THIBAUD J.B. (2008): *AtKCI, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K^+ channels*, «The Plant Journal», 53, pp. 115-123.
- FANG Z., KAMASANI U., BERKOWITZ G.A. (1998): *Molecular cloning and expression characterization of a rice K^+ channel beta subunit*, «Plant Molecular Biology», 37, pp. 597-606.
- FLAGELLA Z., TRONO D., POMPA M., DI FONZO N., PASTORE D. (2006): *Seawater stress applied at germination affects mitochondrial function in durum wheat (Triticum durum) early seedlings*, «Functional Plant Biology», 33, pp. 357-366.
- FORMENTIN E., NASO A., VAROTTO S., PICCO C., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2006): *KDC2, a functional homomeric potassium channel expressed during carrot embryogenesis*, «FEBS Letters», 580, pp. 5009-5015.
- FORMENTIN E., VAROTTO S., COSTA A., DOWNEY P., BREGANTE M., NASO A., PICCO C., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2004): *DKT1, a novel K^+ channel from carrot, forms functional heteromeric channels with KDC1*, «FEBS Letters» 573, pp. 61-67.
- FRATIANNI A., PASTORE D., PALLOTTA M.L., CHIATANTE D., PASSARELLA S. (2001): *Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells*, «Bioscience Reports», 21, pp. 81-91.
- FUCHS I., STOLZLE S., IVASHIKINA N., HEDRICH R. (2005): *Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress*, «Planta», 221, pp. 212-221.

- GARLID K.D., PAUCEK P. (2003): *Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1606, pp. 23-41.
- GAYMARD F., PILOT G., LACOMBE B., BOUCHEZ D., BRUNEAU D., BOUCHEREZ J., MICHAUX-FERRIERE N., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (1998): *Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap*, «Cell», 94, pp. 647-655.
- GEIGER D., BECKER D., VOSLOH D., GAMBALE F., PALME K., REHERS M., ANSCHUETZ U., DREYER I., KUDLA J., HEDRICH R. (2009): *Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K^+ limiting conditions*, «The Journal of Biological Chemistry», doi:10.1074/jbc.M109.017574
- GOBERT A., ISAYENKOV S., VOELKER C., CZEMPINSKI K., MAATHUIS F.J. (2007): *The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^+ conductance and plays a role in K^+ homeostasis*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 104, pp. 10726-10731.
- GROVER G.J., GARLID K.D. (2000): *ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology*, «Journal of Molecular and Cellular Cardiology», 32, pp. 677-695.
- HELLENS R.P., EDWARDS E.A., LEYLAND N.R., BEAN S., MULLINEAUX P.M. (2000): *pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation*, «Plant Molecular Biology», 4, pp. 819-832.
- HOSY E., DUBY G., VÉRY A.A., COSTA A., SENTENAC H., THIBAUD J.B. (2005): *A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context*, «Plant Methods», 19, pp. 1-14.
- HOSY E., VAVASSEUR A., MOULINE K., DREYER I., GAYMARD F., POREE F., BOUCHEREZ J., LEBAUDY A., BOUCHEZ D., VÉRY A.A., SIMONNEAU T., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2003): *The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 100, pp. 5549-5554.
- INOUE I., NAGASE H., KISHI K., HIGUTI T. (1991): *ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane*, «Nature», 352, pp. 244-247.
- LATZ A., IVASHIKINA N., FISCHER S., ACHE P., SANO T., BECKER D., DEEKEN R., HEDRICH R. (2007): *In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca^{2+} -sensitive inward rectifying K^+ channel*, «Planta», 225, pp. 1179-1191.
- LAUS M.N., SOCCIO M., TRONO D., CATTIVELLI L., PASTORE D. (2008): *Plant Inner Membrane Anion Channel (PIMAC) function in plant mitochondria*, «Plant Cell Physiology», 49, pp. 1039-1055.
- LEBAUDY A., VÉRY A.-A., SENTENAC H. (2007): *K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions*, «FEBS Letters», 581, pp. 2357-2366.
- MÄSER P., THOMINE S., SCHROEDER J.I., WARD J.M., HIRSCHI K., SZE H., TALKE I.N., AMTMANN A., MAATHUIS F.J.M., SANDERS D., HARPER J.F., TCHIEU J., GRIBSKOV M., PERSANS M.W., SALT D.E., KIM S.A., GUERINOT M.L. (2001): *Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis*, «Plant Physiology», 126, pp. 1646-1667.
- MEEUSE B.J.D. (1975): *Thermogenic respiration in aroids*, «Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology», 26, pp. 117-126.
- MIRONOVA G.D., NEGODA A.E., MARINOV B.S., PAUCEK P., COSTA A.D., GRIGORIEV S.M., SKARGA Y.Y., GARLID K.D. (2004): *Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K^+ channel (mitoK_{ATP}) and its inward rectifier subunit (mitoKIR)*, «The Journal of Biological Chemistry», 279, pp. 32562-32568.

- MØLLER I.M. (2001): *Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species*, «Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology», 52, pp. 561-591.
- MOREAU C., PROST A.L., DÉRAND R., VIVAUDOU M. (2005): *SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers*, «Journal of Molecular and Cellular Cardiology», 38, pp. 951-963.
- MOULINE K., VERY A.A., GAYMARD F., BOUCHEREZ J., PILOT G., DEVIC M., BOUCHEZ D., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2002): *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K^+ channel in Arabidopsis*, «Genes & Development», 16, pp. 339-350.
- MURA C.V., COSMELLI D., MUNOZ F., DELGADO R. (2004): *Orientation of Arabidopsis thaliana KAT1 channel in the plasma membrane*, «The Journal of Membrane Biology», 201, pp. 157-165.
- OBATA T., KITAMOTO H.K., NAKAMURA A., FUKUDA A., TANAKA Y. (2007): *Rice Shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells*, «Plant Physiology», 144, pp. 1978-1985.
- PASTORE D., TRONO D., LAUS M.N., DI FONZO N., PASSARELLA S. (2001): *Alternative oxidase in durum wheat mitochondria. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role*, «Plant and Cell Physiology», 42, pp. 1373-1382.
- PASTORE D., STOPPELLI M.C., DI FONZO N., PASSARELLA S. (1999): *The existence of the K^+ channel in plant mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 274, pp. 26683-26690.
- PASTORE D., TRONO D., LAUS M.N., DI FONZO N., FLAGELLA Z. (2007): *Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria*, «The Journal of Experimental Botany», 58, pp. 195-210.
- PAUCEK P., DOLGACOVA L., GARLID K.D. (2002): «Biophysical Journal», 82, 109 (Abstract).
- PAUCEK P., MIRONOVA G., MAHDI F., BEAVIS A.D., WOLDEGIORGIS G., GARLID K.D. (1992): *Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 267, pp. 26062-26069.
- PETRUSSE E., CASOLO V., BRAIDOT E., CHIANDUSSI E., MACRÌ F., VIANELLO A. (2001): *The K_{ATP}^+ channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria*, «Journal of Bioenergetics and Biomembranes», 33, pp. 107-117.
- PETRUSSE E., CASOLO V., PERESSON C., KRAJŇÁKOVÁ J., MACRÌ F., VIANELLO A. (2008): *Activity of a channel in Arum spadix mitochondria during thermogenesis*, «Journal of Plant Physiology», 165, pp. 1360-1369.
- PILOT G., LACOMBE B., GAYMARD F., CHEREL I., BOUCHEREZ J., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2001): *Guard cell inward K^+ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2*, «The Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 3215-3221.
- REINTANZ B., SZYROKI A., IVASHIKINA N., ACHE P., GODDE M., BECKER D., PALME K., HEDRICH R. (2002): *AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha-subunit modulates root hair K^+ influx*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 99, pp. 4079-4084.
- RUY F., VERCESI A.E., ANDRADE P.B.M., BIANCONI M.L., CHAIMOVICH E., KOWALTOWSKI A.J. (2004): *A highly active ATP-insensitive K^+ import pathway in plant mitochondria*, «Journal of Bioenergetics and Biomembranes», 36, pp. 195-202.

- SENTENAC H., BONNEAUD N., MINET M., LACROUTE F., SALMON J.M., GAYMARD F., GRIGNON C. (1992): *Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system*, «Science», 256, pp. 663-665.
- SZABÓ I., BOCK J., JEKLE A., SODDEMAN M., ADAMS C., LANG F., ZORATTI M., GULBINS E. (2005): *A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 280, pp. 12790-12798.
- SZYROKI A., IVASHIKINA N., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., ACHE P., REINTANZ B., DEEKEN R., GODDE M., FELLE H., STEINMEYER R., PALME K., HEDRICH R. (2001): *KAT1 is not essential for stomatal opening*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 98, pp. 2917-221.
- TANAKA N., FUJITA M., HANDA H., MURAYAMA S., UEMURA M., KAWAMURA Y., MITSUI T., MIKAMI S., TOZAWA Y., YOSHINAGA T., KOMATSU S. (2004): *Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments*, «Molecular Genetics and Genomics», 271, pp. 566-576.
- TRONO D., FLAGELLA Z., LAUS M.N., DI FONZO N., PASTORE D. (2004): *The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hypersomotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings*, «Plant, Cell and Environment», 27, pp. 437-448.
- TRONO D., SOCCIO M., MASTRANGELO A.M., DE SIMONE V., DI FONZO N., PASTORE D. (2006): *The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP)-related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity*, «Bioscience Reports», 26, pp. 251-261.
- VAIN P., AFOLABI A.S., WORLAND B., SNAPE J.W. (2003): *Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup*, «Theoretical and Applied Genetics», 107, pp. 210-217.
- VERCESI A.E., MARTINS I.S., SILVA M.A.P., LEITE H.M.F., CUCCOVIA I.M., CHAIMOVICH H. (1995): *PUMPing plants*, «Nature», 375, p. 24.
- VOELKER C., SCHMIDT D., MUELLER-ROEBER B., CZEMPINSKI K. (2006): *Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta*, «The Plant Journal», pp. 48, 296-306.
- ZOTTINI M., BARIZZA E., COSTA A., FORMENTIN E., RUBERTI C., CARIMI F., LO SCHIAVO F. (2008): *Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells*, «Plant Cell Reports», 27, pp. 845-853.

GIAN PAOLO ACCOTTO*, CARLA CARUSO**, MARCO CATONI*,
 FABRIZIO CILLO***, GIANDOMENICO CORRADO****, LUIGI DE MASI*****,
 MONICA DE PALMA*****, MARIA RAFFAELLA ERCOLANO*****,
 FRANCESCA FERRIELLO*****, LUIGI FRUSCIANTE*****, MATTEO LORITO*****,
 CONCETTA LOTTI*****, TIZIANA MASCIA***, STEFANO PAVAN*****,
 FRANCESCO PENNACCHIO*****, SILVIA PROIETTI**,
 GERARDO PUOPOLO*****, ROSA RAO****, LUIGI RICCIARDI*****,
 MICHELINA RUOCCO*****, MARINA TUCCI*****, ASTOLFO ZOINA*****

Geni e network genici coinvolti nell'interazione pomodoro/ambiente biotico¹

PREMESSA

Nel loro ambiente naturale, le piante interagiscono in maniera complessa con altri organismi, tra cui parassiti, predatori, patogeni, antagonisti e simbionti. Nel corso della co-evoluzione, i diversi partner di tali interazioni hanno sviluppato sistemi complessi di comunicazione, dai quali dipende l'esito dell'interazione stessa. Data la loro importanza fondamentale, anche ai fini pratici, negli ultimi anni intensi studi si sono concentrati sui meccanismi molecolari che sono alla base delle diverse interazioni, con lo scopo di isolare e comprendere il ruolo dei geni espressi dalla pianta e dai suoi partner, che siano parassiti, patogeni o simbionti, durante la colonizzazione, di identificare le

- * CNR – Istituto di Virologia Vegetale, Torino
- ** Dip. ABAC, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo
- *** CNR – Istituto di Virologia Vegetale, Bari
- **** Dip. Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** CNR – Istituto di Genetica Vegetale, Portici (NA)
- ***** Dip. Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** Dip. Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università di Foggia
- ***** Dip. Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale, Sezione di Genetica e Miglioramento Genetico, Università degli Studi di Bari
- ***** Dip. di Entomologia e Zoologia agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** CNR – Istituto di Protezione delle Piante, Portici (NA)

¹ Curatore Tucci M.. Contributi di: De Palma M., De Masi L., Caruso C., Proietti S., Ruocco M., Lorito M., Tucci M. per il par. 1; Ferriello F., Puopolo G., Zoina A., Ercolano M.R., Frusciante L. per il par. 2; Ricciardi L., Lotti C., Pavan S. per il par. 3; Accotto G.P., Cillo F., Mascia T., Catoni M. per il par. 4; Corrado G., Pennacchio F., Rao R. per il par. 5.

molecole segnale che appaiono nell'interazione, di analizzare la trasduzione del segnale in pianta e di studiare le molecole che appaiono nella risposta della pianta all'interazione. Da tali ricerche è emerso, tra l'altro, che esistono molte analogie tra i diversi sistemi di risposta attivati nel corso delle diverse interazioni, il cui studio potrà senz'altro contribuire a comprendere quali sono i meccanismi cruciali dell'interazione.

I recenti avanzamenti delle tecnologie a disposizione della ricerca scientifica, che hanno reso possibile lo sviluppo della genomica e degli approcci a essa associati (metabolomici, proteomici, trascrittomici ecc.) stanno avendo e avranno un impatto fondamentale anche nello studio delle interazioni tra la pianta e l'ambiente biotico. Oltre all'avanzamento delle conoscenze, i nuovi approcci genomici contribuiranno anche allo sviluppo di prodotti ad alto contenuto tecnologico, quali nuove varietà vegetali più resistenti ai patogeni e ai parassiti e in grado di avvantaggiarsi al massimo delle interazioni benefiche, o nuove strategie di lotta ai fitopatogeni più rispettose dell'ambiente e in grado di assicurare una maggiore qualità e la riduzione dei residui di fitofarmaci nei prodotti agroalimentari.

La costituzione del Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM) ha permesso di polarizzare alte competenze scientifiche e tecnologiche insieme ad avanzate risorse logistico-strumentali di genomica esclusivamente sullo studio e all'analisi del genoma di una sola specie, il pomodoro, di grande rilevanza economica per l'Italia, e per la quale sono inoltre già disponibili grandi risorse e piattaforme genetiche e genomiche, quali mappe genetiche e fisiche ad alta densità; ampie collezioni di marcatori molecolari, di EST (Expressed Sequence Tag) (Barone et al., 2008), di mutanti naturali e indotti (cfr. <http://tgrc.ucdavis.edu>; <http://www.agrobios.it/tilling/>); piattaforme microarray (TOM1 e TOM2, <http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>, chip Affymetrix, <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/tomato.affxspefic/tomato.affx>); nonché piattaforme bioinformatiche per la consultazione e l'elaborazione dei dati (<http://biosrv.cab.unina.it/isola/isola.html> e Barone et al., 2008).

La disponibilità di risorse genetiche e genomiche e la concentrazione di risorse umane e strumentali realizzata attraverso il Laboratorio GenoPOM sta apportando un contributo rilevante anche allo studio delle interazioni tra il pomodoro e l'ambiente biotico, e in particolare delle interazioni con microrganismi benefici, con funghi fitopatogeni, con virus e con insetti. L'integrazione delle conoscenze che si stanno sviluppando potrà risultare particolarmente proficua per l'identificazione delle analogie tra i diversi sistemi

di risposta attivati nel pomodoro dall'interazione con questi diversi partner e quindi per la comprensione dei meccanismi fondamentali dell'interazione.

I. IDENTIFICAZIONE DI GENI E FUNZIONI GENICHE COINVOLTE NELLA RISPOSTA DELLA PIANTA AL FUNGO BENEFICO *TRICHODERMA HARZIANUM*

Tra le interazioni della pianta con l'ambiente biotico, notevole interesse rivestono quelle che essa intrattiene con microrganismi benefici della rizosfera, quali i funghi del genere *Trichoderma*. Tali microrganismi svolgono un'attività diretta di antibiosi e micoparassitismo nei confronti dei funghi patogeni, competendo con questi ultimi per spazio e nutrienti e producendo una grande varietà di sostanze antimicrobiche (es. peptaiboli) e enzimi degradativi (chitinasi, glucanasi ecc.). Inoltre, tali funghi antagonisti instaurano un'interazione di tipo simbiotico con numerose specie vegetali, colonizzando la superficie e gli strati epidermici delle radici e creando una zona d'interazione (Harman et al., 2004 a). In conseguenza di ciò, *Trichoderma* induce risposte simili alla resistenza sistemica indotta (ISR) attivata da rizobatteri non patogeni (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR). L'ISR è una risposta di resistenza sistemica ai patogeni ed è quindi fenotipicamente simile ai sistemi indotti da molecole segnale quali acido salicilico (SA) e jasmonati (JA). Ne differisce però funzionalmente perché, in assenza di un patogeno, non vengono prodotte proteine "pathogenesis-related" (PR) né fitoalessine e in genere non c'è accumulo di SA. Tuttavia, in presenza di ISR, la risposta della pianta all'attacco di un patogeno è amplificata e l'entità della malattia diminuisce. Perciò, ISR potenzia le risposte di difesa della pianta in assenza della cascata di proteine tipiche della risposta mediata da JA e SA.

Analogamente ai PGPR, *Trichoderma* è anche in grado di esercitare un'attività biofertilizzante, stimolando lo sviluppo radicale, favorendo l'assorbimento di acqua e nutrienti e la crescita della parte aerea e, in definitiva, assicurando una maggiore produttività.

La capacità di *Trichoderma* sia di operare il biocontrollo di funghi fitopatogeni sia di promuovere la crescita delle piante e l'assorbimento radicale può apportare un notevole contributo al miglioramento di quegli aspetti dell'agricoltura (difesa contro patogeni e nutrizione delle piante) che attualmente sono affrontati con strategie a elevato impatto sull'ambiente e sulla salute umana (uso massiccio di pesticidi e fertilizzanti) e che hanno un effetto negativo, anche in termini economici, sulla produzione agricola. Entrambe le succitate attività di *Trichoderma* sono fortemente dipendenti dalle rispo-

ste indotte nella pianta dall'interazione col fungo benefico, tanto che è stata dimostrata una forte componente genetica della risposta della pianta a *T. harzianum* T22, almeno in mais (Harman et al., 2004 b; Harman, 2006). Tuttavia, le informazioni disponibili sui determinanti molecolari della risposta della pianta a *Trichoderma*, che viene inizialmente percepito come un patogeno (Harman et al., 2004 a), sono ancora scarse, né sono stati conclusivamente determinati quali, tra i complessi meccanismi di segnalazione operanti in pianta in risposta ai patogeni (tab. 1), vengano attivati dall'interazione con *Trichoderma* spp., benché, in analogia con l'ISR, sia stato ipotizzato un coinvolgimento del jasmonato (Shores et al., 2005).

Allo scopo di contribuire all'identificazione di geni e funzioni geniche del pomodoro rilevanti per l'interazione con *Trichoderma*, è stato innanzitutto condotto, presso il CNR-IGV di Portici in collaborazione con il CNR-IPP di Portici e con il Dip. ARBOPAVE dell'Università di Napoli e il Dip. ABAC dell'Università della Tuscia, uno studio per identificare l'eventuale presenza di variabilità genetica in pomodoro per la capacità di interagire con *Trichoderma*. Gli effetti dell'interazione tra diverse varietà e specie selvatiche di pomodoro e due specie di *Trichoderma*, *T. harzianum* T22 e *T. atroviride* P1, sono stati analizzati in condizioni controllate sia su piante allevate in suolo in serra climatizzata sia in piante allevate in coltura idroponica in cella climatica.

Tali studi hanno permesso di evidenziare, anche in pomodoro, una variabilità dei genotipi analizzati nella risposta a ciascuna delle due specie di microrganismi benefici, sia in termini di accrescimento e sviluppo (fig. 1) sia in termini di tolleranza al patogeno *Botrytis cinerea* (Ruocco et al., 2007).

Tra i diversi genotipi saggiati, è stato selezionato un genotipo che risponde positivamente a *T. harzianum* T22 sia in termini di sviluppo radicale sia di tolleranza al patogeno *B. cinerea*. I cDNA estratti da piante trattate e non con *T. harzianum* T22, a 48 h dall'instaurarsi dell'interazione, sono stati utilizzati per l'allestimento di una libreria sottrattiva mediante la tecnica della "Suppressive Subtraction Hybridisation (SSH) PCR", al fine di identificare geni di pomodoro differenzialmente espressi e quindi potenzialmente coinvolti nell'interazione stessa.

Lo screening della libreria sottrattiva ottenuta ha consentito di identificare numerose sequenze non ridondanti differenzialmente espresse. L'analisi bioinformatica di tali sequenze ha permesso di classificarle in diverse categorie funzionali, evidenziando che la maggior parte delle sequenze sono riconducibili a geni coinvolti nel metabolismo primario e secondario (24 e 22%, rispettivamente), essendo molto rappresentata anche la categoria dei geni attivati nella risposta a stress e/o a patogeni (20%) (fig. 2). Questo ultimo

GENE	FERITA	JA	PATOGENO	SA	ETILENE	PRODOTTO GENICO	ACCESSIONE	BIBLIOGRAFIA
						PROTEINE DELLA PATOGENESI		
PR-P4	nd	0	up	up	nd	PR1acida	AJ011520, M69247	Fidantsef et al. (1999), «Physiol. Mol. Plant Pathology», 54, pp. 97-114; van Kan et al. (1992), «Plant Mol. Biol.», 20, pp. 513-527
PR1a2	nd	nd	0	0	0	PR1acida	Y08844	Tomero et al. (1997), «Mol. Plant Microbe Interact.», 10, pp. 624-635
PR1b1	0	0	up	up	up	PR1 basica	Y08804	Tomero et al. (1997), «Mol. Plant Microbe Interact.», 10, pp. 624-634
PR-P6	nd	nd	up	up	0	PR1		van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
PR2 type I	nd	nd	up	up	up	β -1,3 glucanasi I		van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
PR2 type II	nd	nd	up	up	0	β -1,3 glucanasi II		van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
PR3 type I	nd	nd	up	0	up	chitinasi I (CHI9)	Z15140	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213; Danhash et al. (1993), «Plant Mol. Biol.», 22, pp. 1017-1029
PR3 type II	nd	nd	up	up	no	chitinasi II (CHI3)	Z15141	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213; Danhash et al. (1993), «Plant Mol. Biol.», 22, pp. 1017-1029
PR-P2	nd	nd	up	up	up	PR4	X58548	Linthorst et al. (1991), «Mol. Plant Microbe Interact.», 4, pp. 586-592
PR5	nd	nd	up	up	up	osmotina	M21346	King et al. (1988), «Plant Mol. Biol.», 10, pp. 401-412
PIN-II	up	up	0/up	down	up	inibitore di proteasi	K03291, AY129402	Graham et al. (1985), «J. Biol. Chem.», 260, pp. 6561-64; Zhang et al. (2004), «Plant Physiol. Biochem.», 42, pp. 437-44; Doares et al. (1995), «Plant Physiol.», 108, pp. 1741-1746
P1-pl4					up	proteina P1 (p14)	X68738	Tornero et al. (1993), «Plant Physiol.», 102, p. 325
						STRESS OSSIDATIVO		
GST						glutazione S-trasferasi	EF409975	Unpublished, Gafni and Levy (2007)
						METABOLISMO AROMATICO		
pal						fenilalanina-ammonio liasi	M83314, M90692	Bloksberg, Tesi (1991); Lee et al. (1992), «J. Biol. Chem.», 267, pp. 11824-11830.
						METABOLISMO ACIDI GRASSI		
AOS	up	up	nd	down	up	allene ossido sintasi	AF230371	Howe et al. (2000), «Plant Physiol.», 123, pp. 711-24
loxA	nd	up	up	nd	nd	lipossigenasi	U09026	Ferrie et al. (1994), «Plant Physiol.», 106, pp. 109-118
loxB	nd	up	up	nd	nd	lipossigenasi	U09025	Ferrie et al. (1994), «Plant Physiol.», 106, pp. 109-118
loxC	0	0	nd	nd	nd	lipossigenasi	U37839	Heitz et al. (1997), «Plant Physiol.», 114, pp. 1085-93
loxD	up	up	nd	nd	nd	lipossigenasi	U37840	Heitz et al. (1997), «Plant Physiol.», 114, pp. 1085-93
JA, acido jasmonico; SA, acido salicilico; nd, non determinato; up, induzione; 0, nessun effetto; down, inibizione.								

Tab. 1 Geni inducibili correlati alla difesa in pomodoro (*S. lycopersicum*) e loro attivazione da parte di diverse vie di traduzione del segnale

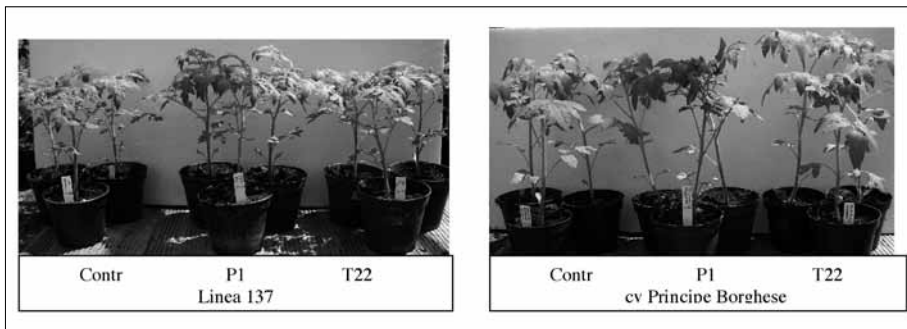


Fig. 1 Sviluppo di piante di pomodoro della linea 137 e della cv. Principe Borghese in risposta alla colonizzazione radicale da parte di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22

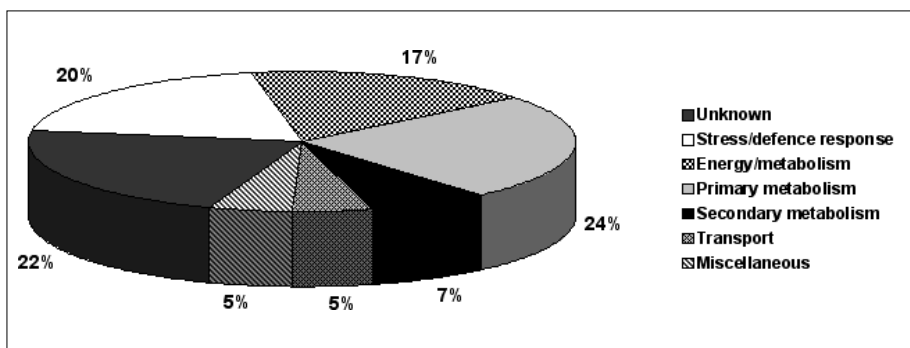


Fig. 2 Annotazione funzionale di cloni cDNA espressi differenzialmente in pomodoro durante l'instaurarsi dell'interazione con *T. harzianum* T22, basata sull'allineamento delle sequenze tramite BlastN

dato conferma che inizialmente, durante la fase della colonizzazione radicale, *Trichoderma* viene percepito dalla pianta come un patogeno, attivando una serie di risposte di difesa che portano al confinamento del fungo nei primi strati corticali della radice (Harman et al., 2004 a).

L'ulteriore caratterizzazione delle sequenze differenzialmente espresse potrà senza dubbio contribuire alla comprensione della risposta del pomodoro a questi microrganismi benefici.

2. STUDIO DEL PROCESSO DI RESISTENZA A *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *RADICIS-LYCOPERSICI* IN POMODORO

La coltivazione di pomodoro in Italia ha una lunga tradizione e il nostro paese figura al terzo posto nella graduatoria mondiale per la produzione e l'esportazione. La coltura del pomodoro è diffusa in quasi tutte le regioni e la sua coltivazione per consumo fresco in serra è in aumento in quanto garantisce redditi maggiori. Da circa un decennio uno dei principali fattori limitanti per la produzione di pomodoro, specialmente in coltura protetta, è rappresentato dagli attacchi parassitari da parte del *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), responsabile del marciume al colletto e alle radici di piante del pomodoro, malattia tra i cui sintomi si annoverano ritardo della crescita, prematura caduta dei cotiledoni, lesioni scure sull'ipocotile, marcescenza delle radici, fino alla morte della pianta. Gli interventi di difesa con mezzi chimici non consentono un efficace controllo della malattia (De Weert et al., 2003), mentre è possibile limitare i danni dal patogeno con opportune pratiche colturali e impiegando varietà resistenti. Una fonte di resistenza a FORL è stata già identificata in *S. peruvianum* e trasferita nel pomodoro coltivato (Wakalounakis et al., 1997). Per pianificare efficaci strategie per la costituzione di nuove varietà resistenti, risulta quindi particolarmente interessante studiare i geni responsabili di tale resistenza attraverso analisi molecolari e genetiche per pianificare efficaci strategie per la costituzione di nuove varietà resistenti. L'impiego di linee isogeniche può essere particolarmente utile a questo scopo. In particolare, è disponibile la linea Momor, che contiene il gene Frl, responsabile della resistenza a FORL, e la varietà isogenica Monalbo, in cui esso è assente. Da vari studi risulta che il gene Frl è localizzato sul cromosoma 9 del pomodoro (Vakalounakis et al., 1997). Sarebbe, quindi, auspicabile individuare la posizione del gene sul cromosoma in modo più preciso per favorire il suo clonaggio, nonché verificare quali geni sono espressi durante il processo di resistenza.

Sulla base di saggi di patogenicità di diversi ceppi di *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (tab. 2), inoculati sulla cv suscettibile di pomodoro Marmande, è stato identificato il ceppo più virulento, Forl Na.

Il ceppo selezionato è stato quindi utilizzato per l'inoculazione di 60 linee di Momor (resistenti) e 60 linee Monalbo (suscettibili), e il processo d'infezione è stato osservato a 0, 15 e 21 gg, effettuando un'analisi visiva del grado di infezione (fig. 3).

Ai tre stadi di infezione sono stati raccolti campioni di piantine inoculate e non, dai quali sono stati estratti i cDNA utilizzati per l'analisi di espressione

Genere	specie	forma specialis	ceppo	Provenienza
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Na	Portici-Micoteca
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Lt	Latina
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To 1	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	ZUM2407	Leiden (Dr. Bloemberg)

Tab. 2 Elenco dei ceppi fungini di *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* saggiati

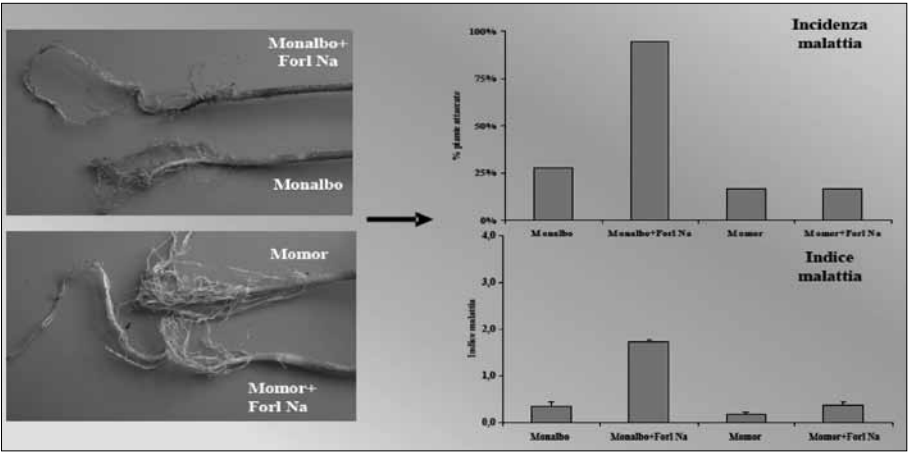


Fig. 3 Diverso grado di infezione di FORL Na tra le linee Momor e Monalbo

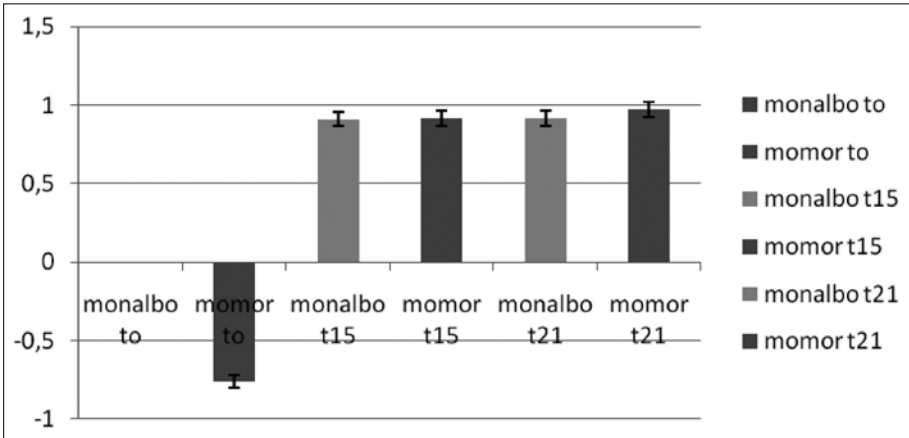


Fig. 4 Profilo d'espressione del gene per la β -Glucosidasi a diversi tempi dall'inoculazione con *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* nelle linee di pomodoro Momor (resistente) e Monalbo (suscettibile)

genetica dei geni per Catalasi, PAL e β -Glucosidasi, considerati marcatori del processo di resistenza, attraverso PCR Real-Time. I risultati ottenuti dimostrano che, nella cultivar resistente, l'espressione dei geni per PAL e Catalasi diminuisce in seguito a inoculazione, mentre il gene per la β -Glucosidasi viene attivato (fig. 4).

3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL *locus ol-2* DI RESISTENZA AD *OIDIUM NEOLYCOPERSICI*

L'Oidio o mal bianco è una malattia trofica delle piante causata da funghi *Ascomycota* appartenenti alla famiglia delle Erysiphaceae. La malattia si sviluppa soprattutto in ambienti umidi e temperati causando severe riduzioni nella produzione delle colture.

Oltre a *Leveillula taurica*, in pomodoro sono stati identificati come agenti eziologici della malattia due specie fungine appartenenti al genere *Oidium*: *O. lycopersici*, diffuso esclusivamente in Australia, e *O. neolycopersici*, una specie emergente che trova ampia diffusione nel resto del mondo.

Numerosi studi volti a identificare fonti genetiche di resistenza verso il patogeno, hanno permesso di mappare 5 geni di resistenza, che conferiscono eredità di tipo dominante specifica per alcuni isolati fungini identificati (Bai et al., 2005), e un solo gene di resistenza recessivo (Ciccarese et al., 1998; 2000). Quest'ultimo, denominato *ol-2*, è stato identificato nell'accessione selvatica di *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* LC-95, che è stata incrociata con la varietà suscettibile SuperMarmande allo scopo di ottenere una popolazione segregante utile per la mappatura del locus genico.

Utilizzando la metodologia della Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore et al., 1991) è stato possibile identificare un marcatore RAPD, trasformato successivamente in marcatore CAPS, strettamente associato al *locus* di resistenza sul braccio corto del cromosoma 4 del genoma del pomodoro (De Giovanni et al., 2004). La conferma del dato di localizzazione è stata ottenuta effettuando la mappatura con linee di introgressione (IL) disponibili in pomodoro (Eshed e Zamir, 1994). In figura 5 è riportata la mappa relativa al cromosoma 4 di pomodoro e la localizzazione del gene *ol-2* effettuata mediante le citate IL.

Proseguendo nelle ricerche sono stati identificati altri 7 marcatori di tipo AFLP risultati polimorfici tra i parentali e tra due bulk costituiti con un definito numero di individui F_2 resistenti e suscettibili all'attacco del patogeno e associati al locus *ol-2*. Inoltre, adottando una tecnica

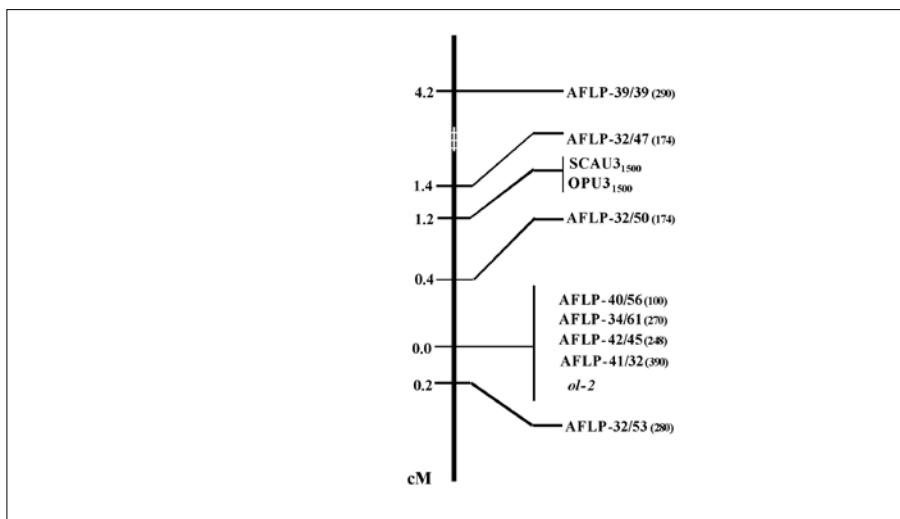


Fig. 6 Mappa di associazione del locus *ol-2* del pomodoro ottenuta con marcatori AFLP

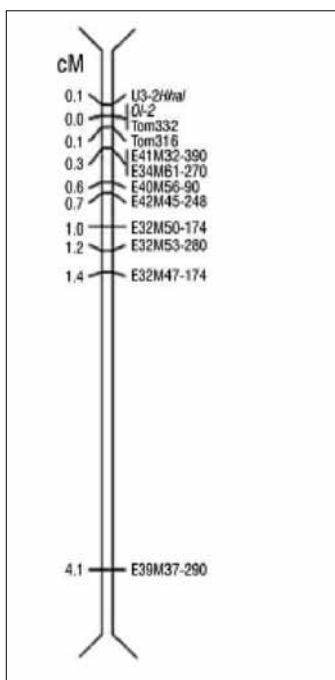


Fig. 7 Mappa integrata del cromosoma 4 di pomodoro ottenuta con marcatori di tipo SSR utilizzando una popolazione di 316 individui derivante dall'incrocio tra LC-95 e la cultivar Money Maker

4. GENOMICA DELLE INTERAZIONI POMODORO-VIRUS

Lo studio a livello molecolare delle interazioni pianta-virus, negli stadi più precoci del processo infettivo, costituisce attualmente una delle aree di ricerca più interessanti della fitovirologia e rappresenta un importante supporto alla costituzione di varietà resistenti o tolleranti alle virosi. Nuovi strumenti molecolari, quali le tecnologie del DNA ricombinante e l'isolamento di geni di resistenza nella pianta ottenuti negli ultimi 10 anni, hanno fornito basilari conoscenze in merito al ruolo di specifiche sequenze virali nel processo infettivo e in merito alle risposte della pianta. Strumenti avanzati di analisi dell'espressione genica sono attualmente disponibili e vengono applicati all'identificazione di geni coinvolti nei più diversi processi biologici, incluse le interazioni pianta-patogeno.

A partire dalla loro comparsa come strumenti di analisi differenziale dell'espressione genica, i microarrays (Schena et al., 1995) hanno permesso l'individuazione anche in pianta, di centinaia di geni potenzialmente implicati nel controllo di differenti fenomeni biologici, in particolare in *Arabidopsis*.

L'analisi dei profili trascrizionali nelle interazioni pianta-patogeno ha contribuito in modo significativo alla ricerca inerente la resistenza della piante nei confronti di patogeni diversi. Alcuni importanti meccanismi molecolari sono stati chiariti, la cui conoscenza potrà fornire un supporto fondamentale allo sviluppo di strumenti di difesa sostenibile nei confronti delle malattie delle piante. Le alterazioni trascrizionali associate alla difesa sono state studiate, in *Arabidopsis*, prevalentemente mediante DNA microarrays (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000; van Wees et al., 2003; Whitham et al., 2003; Marathe et al., 2004; Eulgem, 2005). Questi studi hanno già permesso l'identificazione di un numero impressionante di geni potenzialmente implicati nelle risposte di difesa e di resistenza. Alcuni di questi geni possono essere ricondotti a una azione antimicrobica o a trasduzioni di segnali che notoriamente operano nelle resistenze, ma in molti altri casi il coinvolgimento nella resistenza dei geni individuati è meno ovvio e rimane tutto da indagare. Lo studio su larga scala dei profili trascrizionali nelle interazioni incompatibili, ha anche rivelato interessanti similitudini nelle risposte a patogeni diversi, come pure l'esistenza di connessioni nei pathways di risposta alla patogenesi e allo stress abiotico (Reymond, 2001; Wan et al., 2002; Wise et al., 2007). Molto rimane invece da capire per quanto riguarda le basi molecolari della compatibilità e la determinazione dei sintomi, molto meno note, anche dal punto di vista dell'espressione genica. Alcuni studi hanno riguardato l'analisi su larga scala delle alterazioni trascrizionali associate alle infezioni di virus o

di viroidi (rivisti in Wise et al., 2007). Tali studi evidenziano l'esistenza di gruppi di trascritti modulati in modo specifico come pure di funzioni comunemente alterate a livello trascrizionale dall'infezione con virus diversi o con altri patogeni delle piante.

Il lavoro svolto ha mirato all'esame dettagliato, mediante la tecnologia del microarray, delle alterazioni del profilo trascrizionale di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) in seguito a infezione con *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e ceppi diversi di *Cucumber mosaic virus* (CMV).

TSWV, specie tipo del genere *Tospovirus*, famiglia *Bunyaviridae*, è un virus estremamente diffuso, in grado di infettare centinaia di specie vegetali, tra cui numerose specie coltivate, di cui costituisce uno dei principali patogeni su scala mondiale. Su pomodoro, TSWV causa la malattia dell'avvizzimento maculato, anche nota come bronzatura, che può portare in caso di infezioni precoci alla morte prematura della pianta infetta.

CMV, specie tipo del genere *Cucumovirus*, famiglia *Bromoviridae*, è costituito da particelle poliedriche che incapsidano separatamente tre RNA genomici monocatenari di senso positivo. Oltre che gli RNA genomici e subgenomici, alcuni ceppi di CMV incapsidano un RNA satellite (satRNA), una piccola molecola lineare di RNA che dipende totalmente dal genoma virale per la sua replicazione, incapsidazione e diffusione. I satRNA di CMV non hanno capacità codificante e sono presenti in natura in numerose varianti in grado di alleviare o di aggravare i sintomi indotti dal virus di supporto. Questo effetto è particolarmente evidente in pomodoro, dove la presenza di satRNA è a volte associata a gravi malattie di campo (Garcia-Arenal and Palukaitis, 1999).

I quattro principali quadri sintomatologici indotti su pomodoro da varie combinazioni di CMV e satRNA possono essere così riassunti: a) riduzione della crescita, mosaico e laciniatura fogliare (filimorfismo, sintomo della "foglia di felce"), indotto dalla maggior parte dei ceppi di CMV naturalmente privi di satRNA (es. CMV-Fny); b) assenza di sintomi, co-determinata da ceppi di CMV supportanti varianti "benigne" di satRNA (CMV-Fny/Tfn-satRNA, o FB); c) nanismo apicale (CMV-Fny/TTS-satRNA, o FS); d) necrosi letale, co-determinata da ceppi di CMV supportanti varianti necrogeniche di satRNA (CMV-Fny/77-satRNA, o FN) (Cillo et al., 2007).

Obiettivo della ricerca è stato una migliore comprensione delle interazioni tra pomodoro e i suoi principali virus patogeni, ricercando con approcci di trascrittomica geni e vie metaboliche alterati che possano indicare le basi molecolari della malattia.

Nel caso di TSWV in pomodoro, è stata analizzata la risposta trascrizionale, a seguito di infezione, sia su foglie che su radici (Catoni et al., 2009).

L'infezione è stata valutata a 14 giorni dall'inoculazione, momento nel quale sono visibili i sintomi della virosi (riduzione di crescita e prime bronzature sulle foglie). A questo stadio, la quantità di RNA virale rilevata in foglie e radici non ha mostrato differenze significative (fig. 8), dimostrando come l'infezione sia sistemizzata.

Numerosi geni regolati diversamente nei due organi sono stati identificati e un campione di essi è stato validato mediante qRT-PCR. L'infezione virale ha indotto espressione differenziale di 2385 geni nelle foglie e 1166 nelle radici (fig. 9).

Nonostante la concentrazione del virus fosse equivalente nei due organi, i confronti hanno rilevato numerose differenze. Nelle foglie geni correlati a difesa e trasduzione del segnale erano indotti, mentre vi era una generale repressione di geni correlati al metabolismo primario e secondario, e al metabolismo degli amminoacidi. Nelle radici l'espressione di geni coinvolti in metabolismo primario e trasduzione del segnale non era alterata dall'infezione di TSWV, mentre appariva indotta la risposta a stimoli biotici e il metabolismo degli amminoacidi implicati nella sintesi di composti secondari, mentre risultava repressa (o inalterata) la risposta a stimoli abiotici. Un'analisi dettagliata ha evidenziato inoltre differenze nei geni del metabolismo dell'ABA, della risposta a ormoni e ROS, del metabolismo di carotenoidi e poliammine (fig. 10).

Per indagare sulle alterazioni dei profili trascrizionali associate a infezioni di CMV/satRNA, piante di pomodoro sono state inoculate allo stadio cotiledonare con le quattro combinazioni indicate, e l'RNA totale è stato estratto a due tempi diversi dopo l'infezione, a 2 e 9 giorni (gg), per esaminare l'espressione differenziale a livello locale e a livello sistemico, rispettivamente.

I geni modulati sono stati raggruppati in categorie funzionali, allo scopo ottenere un quadro complessivo delle vie metaboliche interessate dalle infezioni dei diversi ceppi. 1179 geni sono risultati modulati (cioè sovraespressi almeno del doppio o sottoespressi almeno della metà rispetto al controllo sano) in almeno una condizione sperimentale; le modulazioni più ampie sono determinate da CMV-Fny e le più modeste da CMV-FB, sia a 2 che a 9 gg (fig. 11).

L'infezione di CMV-Fny privo di satRNA, sia a 2 che a 9 gg determina una rimodulazione trascrizionale di gran lunga superiore a quella che si osserva in co-inoculazione con i diversi satelliti, che indipendentemente dagli effetti sulla sintomatologia sembrano contrastare gli effetti dell'infezione virale sull'espressione genica. L'effetto dell'infezione di CMV-Fny sulla trascrizione è più marcato a 2 gg rispetto a 9gg, mentre in caso di coinfezione con i diversi

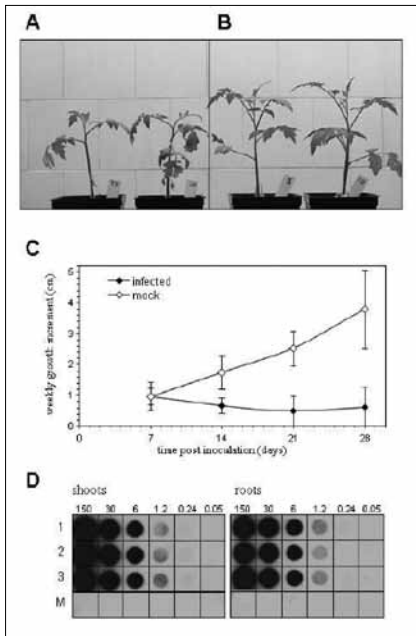


Fig. 8 Crescita di piante di pomodoro a seguito di infezione da TSWV. A: piante infette; B: non infette, a 14 giorni dall'inoculazione. C: incrementi settimanali di crescita. Le barre di errore rappresentano intervalli di confidenza del 95%. D: rilevamento di TSWV in parti aeree (shoots) e radicali (roots) di piante di pomodoro (1,2,3) a 14 giorni dall'inoculazione (i numeri in alto indicano le quantità (ng) di RNA totale in ogni spot)

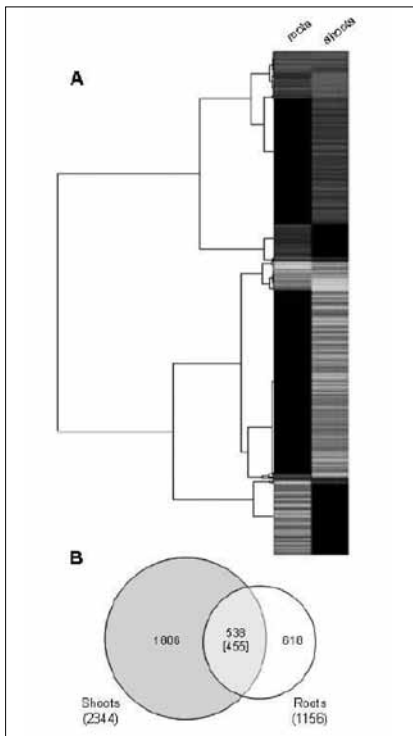


Fig. 9 Profili di espressione genica ottenuti da piante di pomodoro infette da TSWV. A: Clustering gerarchico dei profili di espressione differenziale di 2.962 geni. In rosso i geni con espressione aumentata nelle piante infette, in verde quelli sotto-espressi. B: Diagramma di Venn. Il numero di geni espressi in entrambi gli organi della pianta sono nelle parti sovrapposte dei cerchi; il valore in parentesi quadra indica il numero di geni regolati nella stessa direzione

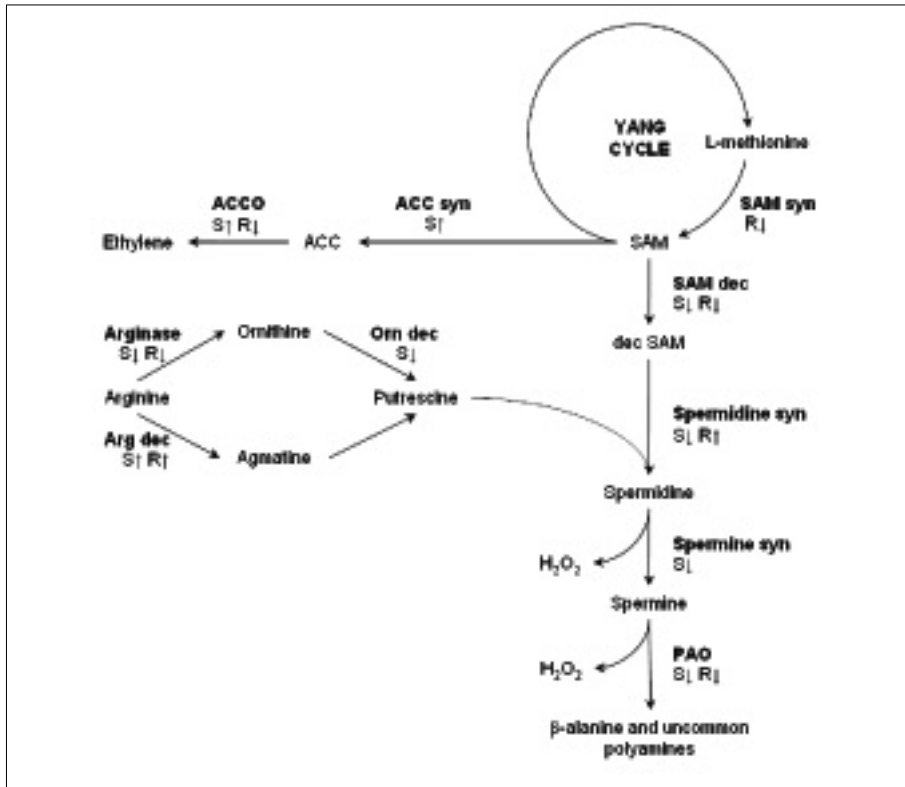


Fig. 10 Espressione differenziale di geni coinvolti nella biosintesi di etilene e poliammine. La regolazione prevalente è indicata dalla direzione delle frecce a destra di S (shoots) e R (roots). Abbreviazioni: SAM syn, S-adenosyl-methionine synthase; SAM dec, S-adenosyl-methionine decarboxylase; Spermidine syn, spermidine synthase; Spermine syn, spermine synthase; PAO, polyamine oxidase; Orn dec, ornithine decarboxylase; Arg dec, arginine decarboxylase; ACC syn, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase; ACCO, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase; SAM, S-adenosyl-methionine; dec SAM, decarboxylated S-adenosyl-methionine; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

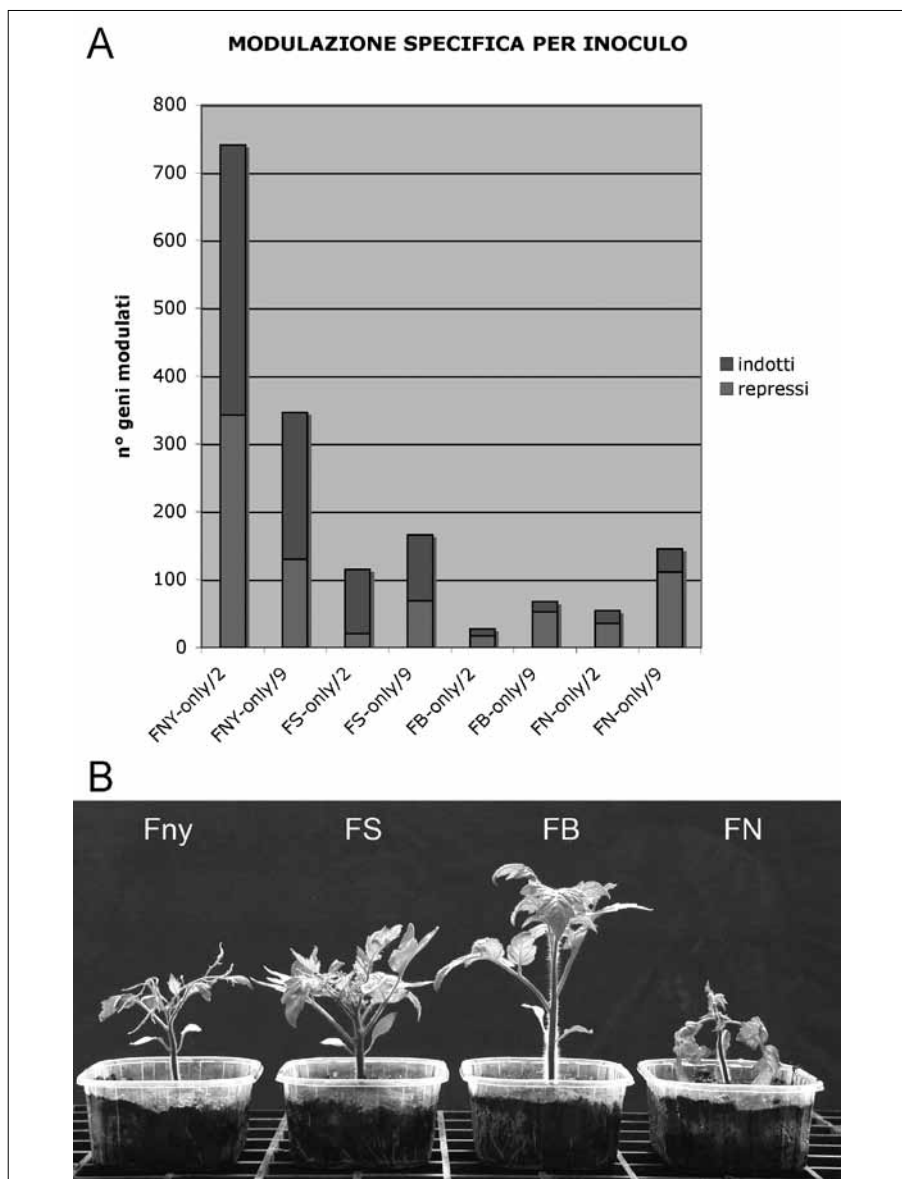


Fig. 11 *Modulazione dell'espressione genica specifica per inoculo indotta su pomodoro da quattro combinazioni di CMV/satRNA. A, numero di geni modulati (indotti almeno del doppio e repressi almeno della metà) da singole combinazioni di inoculo nei due intervalli di tempo dopo l'inoculazione (2 e 9 giorni); B, Sintomi su giovani piantine di pomodoro a 21 giorni dall'inoculazione, associati alle infezioni della quattro combinazioni di inoculo considerate: Fny, ceppo CMV-Fny privo di satRNA; FS, ceppo CMV-Fny/TTS-satRNA; FB, ceppo CMV/Tfn-satRNA; FN, ceppo CMV-Fny/77-satRNA*

satelliti il numero di geni interessati alle alterazioni trascrizionali è maggiore a 9gg rispetto a 2gg.

È possibile individuare un gruppo di geni che sono modulati in tutti i tipi di infezione (13 geni a 2gg e 31 geni a 9gg), e che presentano sempre una modulazione concordante, ovvero positiva o negativa in tutti i casi. Questi geni vanno a definire un “core” di modulazioni trascrizionali caratteristiche dell’infezione di CMV in pomodoro, indipendenti dal satellite associato. Per contro, appare anche interessante considerare gli effetti trascrizionali specifici di ciascun tipo di infezione. Prendendo in esame le categorie funzionali specificamente modulate nelle diverse interazioni si nota in tutte le interazioni una modulazione ampia di geni associati al metabolismo primario, osservazione già riportata per molte interazioni pianta-patogeno sia compatibili che incompatibili. Colpisce invece particolarmente l’elevato numero di geni che ricadono nella categoria della trasduzione del segnale, la quale rappresenta tra il 10 e il 20% dei geni modulati specificamente in ciascuna interazione. Appare inoltre interessante notare che la categoria “resistenza” è assente nelle modulazioni di CMV-FB, sia a 2 sia a 9gg, mentre è presente in tutti gli altri casi (fig. 12).

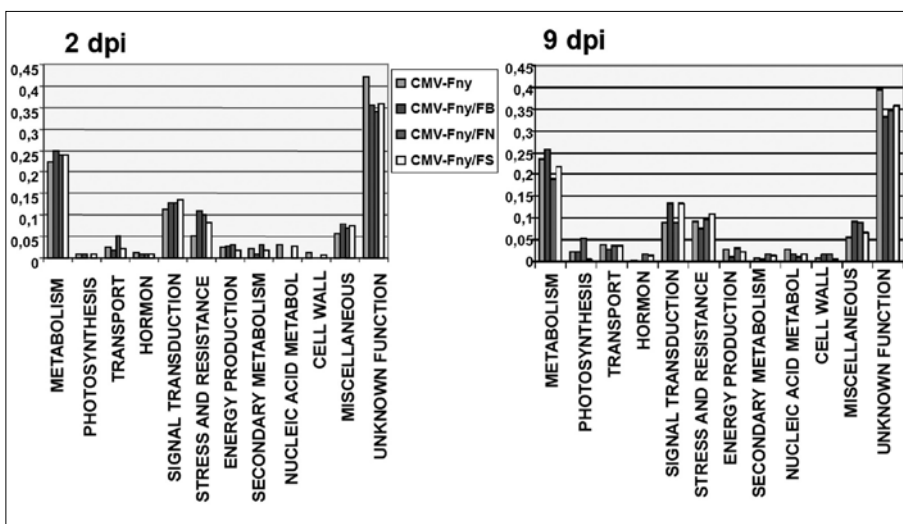


Fig. 12 Percentuali di geni assegnati alle differenti categorie funzionali a 2 e 9 giorni dall'inoculazione, in relazione al numero totale di geni modulati in ognuna delle quattro combinazioni CMV/satRNA considerate (1=100%)

5. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLA RESISTENZA DIRETTA E INDIRETTA AD AFIDI IN ACCESSIONI DI POMODORO

Il pomodoro viene attaccato da numerosi parassiti, principalmente insetti. Nonostante l'uso di strategie di lotta chimica, questi ultimi riducono notevolmente la resa e la qualità della produzione. Per questo motivo, notevoli sforzi sono stati indirizzati verso la caratterizzazione dei tratti e dei geni all'interno del genere *Solanum* che conferiscono resistenza agli insetti. Tutti questi studi hanno anche permesso di rivelare un livello di dettaglio e complessità nelle interazioni pomodoro - insetto dannoso - nemico naturale che è probabilmente unica tra le piante coltivate (Kennedy, 2003).

Gli afidi, come *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera, Aphididae), sono tra gli insetti più dannosi del pomodoro, causando gravi perdite per la loro attività di sottrazione di alimenti e per la trasmissione di virus fitopatogeni (Lange e Bronson, 1981). Il controllo degli afidi è principalmente ottenuto con insetticidi, e l'eventuale uso di misure di controllo più sostenibili è quanto mai necessaria. Tra queste, strategie che si basano sul germoplasma resistente e l'impiego di agenti di controllo biologico appaiono particolarmente promettenti.

È stato recentemente proposto che due processi sono coinvolti nella risposta delle piante ad afidi (Smith e Boyko, 2007). Il primo si basa sul riconoscimento del tipo gene-per-gene di elicitori di difesa degli afidi, e coinvolge i cosiddetti geni di resistenza (R) delle piante. Il secondo processo si basa sul riconoscimento da parte delle piante dei danni causati dalla continua alimentazione degli afidi. Tale individuazione è seguita da reazioni molecolari che coinvolgono diverse vie metaboliche, principalmente quelle che riguardano la produzione di jasmonati, salicilati, etilene, acido abscissico e acido gibberellico (Thompson e Goggin, 2006). Per questo motivo, è stato discusso che la resistenza delle piante agli afidi possa anche essere basata su pattern di espressione di specifici geni che sono coinvolti nella reazione generale di difesa contro lo stress (Smith e Boyko, 2007).

Gli ecotipi e le accessioni locali hanno spesso delle caratteristiche agronomiche di notevole interesse e per questo motivo essi potrebbero svolgere un ruolo importante in sistemi agricoli "sostenibili". Anche se alcuni tratti (ad es: gusto, forma e colore della bacca) sono attualmente sfruttati per mercati di nicchia, l'importanza delle accessioni locali per sistemi agricoli caratterizzati da un ridotto uso di pesticidi oppure per il "management" della resistenza ai parassiti è in gran parte inesplorato.

Utilizzando un sistema tritrofico costituito da *Solanum lycopersicum* - *M. euphorbiae* - *A. ervi* abbiamo identificato genotipi di pomodoro con livelli più elevati di resistenza diretta e indiretta agli afidi. Il DNA *fingerprinting* ha indicato che questi genotipi, chiamati AN5 e AN7, sono geneticamente diversi tra loro (e distinti da altre varietà commerciali) e di conseguenza, anche le loro prestazioni contro gli afidi sono state diverse. Sul genotipo AN5, studi di laboratorio hanno indicato che pochi afidi hanno raggiunto lo stadio adulto e nessuno si è riprodotto, implicando che una popolazione di afidi tende a ridursi e a scomparire su questo genotipo. Su AN7, i saggi biologici hanno indicato la mancata colonizzazione diffusa di afidi. La resistenza diretta in questi due genotipi è associata a una maggiore attrattività verso l'imenottero parassitoide *A. ervi*. Il livello di attrattività costitutivo della AN5 è risultato simile a quello registrato quando lo stesso parassitoide è stato testato con piante di fava infestate da *Acyrtosiphon sativum* (Du et al., 1996). La capacità di reclutare i nemici naturali dei parassiti ha trovato fondamento nel profilo dei composti organici volatili (VOC) emessi dai genotipi allo studio. Tali composti, specificatamente rilasciati a seguito di ferita o lacerazione dei tessuti vegetali, sono importanti per attrarre i predatori e i parassitoidi degli insetti fitofagi. L'analisi dei VOC ha indicato che AN5 ha un'emissione più elevata di tre importanti composti che regolano il comportamento di volo di *A. ervi*. Concordemente ai dati dei saggi comportamentali, sono state osservate delle differenze minori nella composizione dei volatili tra AN7 e M82, la varietà di pomodoro suscettibile agli afidi usata come controllo.

È probabile che l'elevato livello di resistenza agli afidi osservata nei genotipi AN5 e AN7 sia dovuta alla presenza di composti attivi sia nella difesa diretta che in quella indiretta (Bruce et al., 2008).

Successivamente, poiché la reazione della pianta a stress biotici prevede l'attivazione di diversi geni di difesa, abbiamo voluto verificare se geni di risposta agli afidi sono sovraespressi nei genotipi resistenti. In primo luogo, abbiamo identificato alcuni geni che vengono attivati da un attacco prolungato di afidi. I geni sono stati selezionati considerando il loro ruolo nella principali vie di difesa nel pomodoro (salicilato, etilene, jasmonato). I dati hanno indicato che, come previsto, la risposta di pomodoro all'attacco afidico è complessa, visto che coinvolge diverse vie di trasduzione del segnale difesa. Successivamente abbiamo analizzato il livello di espressione costitutivo di questi geni nei genotipi resistenti e suscettibili (fig. 13). I risultati suggeriscono fortemente che la resistenza osservata negli ecotipi AN5 e AN7, anche se molto probabilmente multifattoriale, è legata a un più alto livello di espres-

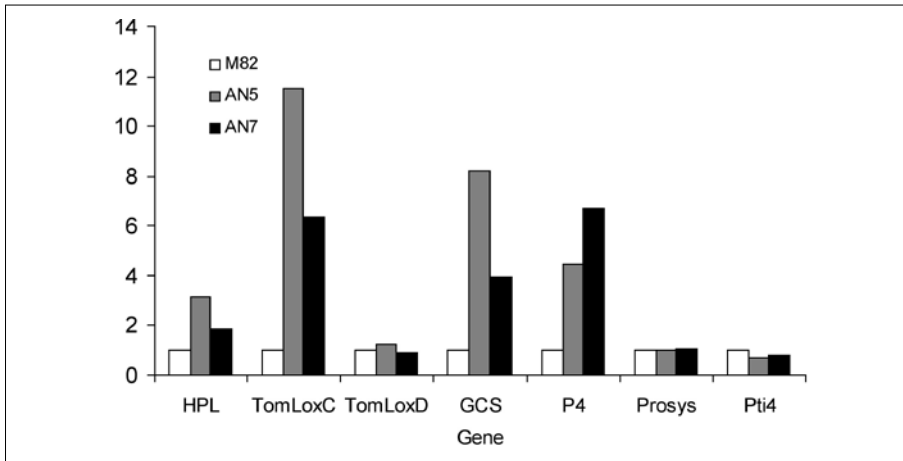


Fig. 13 *Analisi di espressione genica nei genotipi suscettibili (M82) e resistenti (AN5 e AN7). Il grafico mostra la quantità relativa per ogni gene bersaglio, indicata su una scala lineare rispetto al calibratore, la varietà M82 (colonne bianche)*

sione costitutiva dei geni di risposta ad afidi. Geni di difesa con elevati livelli di espressione costitutiva in genotipi resistenti a stress biotici sono stati trovati anche in altre specie vegetali. Diversamente da quanto riportato fino a ora in letteratura, è interessante che le differenze tra i nostri genotipi resistenti e il pomodoro suscettibile riguardano geni la cui attività è chiaramente legata alla resistenza diretta e indiretta contro gli insetti. In futuro sarà stimolante andare a effettuare un'analisi trascrittomica più completa per identificare ulteriori geni differenzialmente espressi.

In conclusione, questo studio ha identificato genotipi coltivati di pomodoro che sono resistenti agli afidi e geni che sono fortemente implicati nella resistenza contro afidi. Anche se ulteriori studi sono necessari per dipanare la complessità della base genetica dei tratti osservati, i nostri risultati dimostrano che il germoplasma tradizionale rappresenta un'importante fonte di materiale che può essere di interesse per l'agricoltura a basso input o per l'agricoltura biologica.

RIASSUNTO

Nell'ambito del progetto Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM, MIUR art. 12 DM 593/00), e anche grazie alle piattaforme tecnologiche messe in essere, sono stati condotti appro-

fonditi studi sulle complesse interazioni che le piante intrattengono con l'ambiente biotico, che hanno permesso di confermare l'esistenza di molte analogie tra i meccanismi attivati nel corso delle diverse interazioni. Studi di trascrittomica hanno consentito sia di allestire una collezione di sequenze differenzialmente espresse in risposta al fungo benefico *Trichoderma harzianum*, la cui caratterizzazione contribuirà a comprendere i meccanismi che sono alla base del miglioramento della crescita e della resistenza a patogeni indotti dall'interazione, sia di evidenziare geni e vie metaboliche alterate nel corso dell'infezione di *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). L'infezione di TSWV modula l'espressione genica in modo differenziale in diversi tessuti, in particolare a carico di geni del metabolismo di ABA, ormoni e poliammine e della risposta a ormoni e ROS. Molti dei geni modulati dall'infezione con CMV sono associati al metabolismo primario, mentre un'altra consistente frazione riguarda la trasduzione del segnale. Inoltre, diversi ceppi di CMV modulano l'espressione genica in modo differente, anche se è stato identificato un gruppo di geni "core", caratteristico della risposta di pomodoro a CMV. Sono stati condotti studi per l'identificazione di marcatori molecolari associati alla resistenza a funghi patogeni (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, FORL, e *Oidium neolycopersici*), da impiegare in programmi di miglioramento genetico assistito, che hanno permesso l'isolamento del gene *ol-2* di resistenza a *O. neolycopersici*. Infine, sono state identificate accessioni locali di pomodoro con un'elevata resistenza ad afidi, la cui caratterizzazione ha dimostrato che la resistenza è dovuta in parte a meccanismi di resistenza diretta e in parte ad una maggiore capacità di reclutare nemici naturali di tali parassiti attraverso un diverso profilo dei composti organici volatili (VOC) emessi dalla pianta.

ABSTRACT

In the frame of the project "Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro" (GenoPOM, MIUR art. 12 DM 593/00) and due also to the technological platforms implemented, the responses of tomato to other organisms have been characterised in depth, confirming that many analogies exist between mechanisms activated in response to different interactions. Transcriptomic approaches were used to study the interactions between tomato and either the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* or *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) or *Cucumber mosaic virus* (CMV). A collection of tomato sequences differentially expressed in response to *T. harzianum* was obtained, whose characterisation will contribute to the understanding of the mechanisms underlying the stimulation of plant growth and resistance to pathogens induced by this interaction. TSWV infection modulates gene expression differentially in different tissues, especially of genes involved in ABA, hormones and poliammine metabolisms and in the response to hormones and ROS. Most genes modulated by CMV infection are associated with primary metabolism or involved in signal transduction. Besides, different strains of CMV modulate gene expression in peculiar ways, although a core of genes was identified as characteristic of the response of tomato to CMV. With the aim of breeding tomato varieties improved for their resistance to fungal pathogens (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, FORL, e *Oidium neolycopersici*) through assisted selection, molecular markers strictly associated to resistance loci have been identified. This led also to the isolation of *ol-2*, a gene for resistance to

O. neolycopersici. Finally, local accessions of tomato have been identified with strong resistance to aphids. Their characterisation demonstrated that this resistance is partly due to direct defence mechanisms but also to an increased ability of these accessions to attract natural enemies of aphids through a different composition of volatile organic compounds (VOC) produced by the plant.

BIBLIOGRAFIA

- BAI Y., VAN DER HULST G., BONNEMA C.M., THIERRY F., MEIJER-DEKENS F., NIKS R.E., LINDHOUT P. (2005): *Tomato defence to Oidium lycopersici: dominant Ol genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive ol-2*, «Mol. Plant-Microbe Interact.», 18 (4), pp. 354-362.
- BAI, Y., PAVAN, S., ZHENG, Z., ZAPPEL, N., LOTTI, C., DE GIOVANNI, C., RICCIARDI, L., LINDHOUT, P., VISSER, R., THERES, K., R. PANSTRUGA, (2008): *Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of LeMLO1 function*, «Molec. Plant-Microbe Interact.», 21, pp. 30-9.
- BARONE A., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., GIULIANO G., GRANDILLO S., FRUSCIANTE L. (2008): *Structural and functional genomics of tomato*, «Int. J. Plant Genomics», doi: 10.1155/2008/820274.
- BRUCE T.J., MATTHES M.C., CHAMBERLAIN K., WOODCOCK C.M., MOHIB A., WEBSTER B., SMART L.E., BIRKETT M.A., PICKETT J.A., NAPIER J.A. (2008): *cis-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 105, pp. 4553-4558.
- CATONI M., MIOZZI L., FIORILLI V., LANFRANCO L., ACCOTTO G.P. (2009): *Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by Tomato spotted wilt virus reveals organ-specific transcriptional responses*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», in stampa.
- CICCARESE F, RICCIARDI L., AMBRICO A., DE GIOVANNI C., SINISCALCO A. (2000): *Biological and molecular characterization of the ol-2 resistance gene in tomato*, Proc. of the "Fifth Congress of the European Foundation for Plant Pathology on Biodiversity in Plant Pathology", Taormina, Giardini Naxos, Italy, September 18-22, p. 425-428.
- CICCARESE F, AMENDUNI M., SCHIAVONE D., CIRULLI M. (1998): *Occurrence and inheritance of resistance to powdery mildew (Oidium lycopersici) in Lycopersicon species*, «Plant Pathol.», 47, pp. 303-311.
- CILLO, F., PASCIUTO, M. M., DE GIOVANNI, C., FINETTI-SIALER, M. M., RICCIARDI, L., GALLITELLI, D. (2007): *Response of tomato and its wild relatives in the genus Solanum to Cucumber mosaic virus and satellite RNA combinations*, «J. Gen. Virol.», 88, pp. 3166-3176.
- DE GIOVANNI C., DELL'ORCO P., BRUNO A., CICCARESE F., LOTTI C., RICCIARDI L. (2004): *Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (ol-2)*, «Plant Sci.», 166, pp. 41-48.
- DE WEERT S., KUIPER I., LAGENDIJK E.L., GERDA E.M., LAMERS G.E., LUGTENBERG B.J. (2003): *Role of chemotaxis toward Fusaric acid in colonization of hyphae of Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici by Pseudomonas fluorescens, WCS365* «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, 11, pp. 1185-1191.

- DU YJ, POPPY GM, POWELL W. (1996): *Relative importance of semiochemicals from first and second trophic level in host foraging behaviour of Aphidius ervi*, «J. Chem. Ecol.», 22, pp. 1591-1606.
- ESHED Y., ZAMIR D. (1994): *A genomic library of Lycopersicon pennellii in L. esculentum: a tool for fine mapping of gene*, «Euphytica», 79, pp. 175-179.
- EULGEM T. (2005): Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome, «Trends Plant Sci.», 10, pp. 71-78.
- GALLITELLI D. (2000): *The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture*, «Virus Res.», 71, pp. 9-21.
- GARCIA-ARENAL, F., PALUKAITIS, P. (1999): *Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 239, Satellites and defective viral RNAs, pp. 37-63.
- HARMAN G.E. (2006): *Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp.*, «Phytopathology», 96, pp. 190-194.
- HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004 a): *Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts*, «Nat. Rev. Microbiol.», 2, pp. 43-56.
- HARMAN G.E., PETZOLDT R., COMIS A., CHEN J. (2004 b): *Interactions between Trichoderma harzianum strain T22 and maize inbred Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by Pythium ultimum and Colletotrichum graminicola*, «Phytopathology», 94, pp. 147-153.
- KENNEDY G.G. (2003): *Tomato, Pests, parasitoids, and predators: Tritrophic interactions involving the genus Lycopersicon*, «Annu. Rev. Entomology», 48, pp. 51-72.
- LANGE W.H., BRONSON L. (1981): *Insect pests of tomato*. Ann. Rev. Entomology 26, pp. 345-371.
- MALECK K, LEVINE A, EULGEM T, MORGAN A, SCHMID J, LAWTON KA, DANGL JL, DIETRICH RA. (2000): *The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance*, «Nat. Genet.», 26, pp. 403-10.
- MARATHE R., GUAN Z., ANANDALAKSHMI R., ZHAO H., DINESH-KUMAR S.P. (2004): *Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray*, «Plant Mol Biol.», 55, pp. 501-520.
- MICHELMORE R. W., PARAN I., KESSELI R.V. (1991): *Identification of markers linked to disease-resistance gene by Bulk Segregant Analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregatings*, «Genetics», 88, pp. 9828-9832.
- PAVAN S., ZHENG Z., VAN DEN BERG P., LOTTI C., DE GIOVANNI C., BORISOVA M., LINDHOUT P., DE JONG H., RICCIARDI L., VISSER R., BAI Y. (2008): *Map vs. homology-based cloning for the recessive gene ol-2 conferring resistance to tomato powdery mildew*. Euphytica 162, pp. 91-98.
- REYMOND P. (2001): *DNA microarrays and plant defence*, «Plant Physiol. Biochem.», 39, pp. 313-321.
- RICCIARDI L., LOTTI C., PAVAN S., BAI Y., LINDHOUT P., DE GIOVANNI C. (2007): *Further isolation of AFLP and LMS markers for the mapping of the Ol-2 locus related to powdery mildew (Oidium neolyopersici) resistance in tomato (Solanum lycopersicum L.)*, «Plant Sci.» 172, pp. 746-755.
- RUOCO M., DE MASI L., SORIENTE I., DE PALMA M., D'AMORE R., LORITO M., TUCCI M. (2007): *Trichoderma-plant interactions are modulated by the plant genotype*, XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento (Italia) 21-27 Luglio 2007, abs. PS 16-910.

- SCHEMA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995): *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*, «Science» 70, pp. 467-470.
- SCHENK P.M., KAZAN K., WILSON I., ANDERSON J.P., RICHMOND T., SOMERVILLE S.C., MANNERS J.M. (2000). *Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 97, pp. 11655-11660.
- SCHUPP J.M., PRINCE A., KLEVYTSKA, KEIM P. (1999): *Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression*, «PCR Biotechnol.», 26, pp. 905-912.
- SHORESH M., YEDIDIA I., CHET I. (2005): *Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum (T-203)*, «Phytopathology», 95, pp. 76-84.
- SIMON A.E., ROOSSINCK M.J., HAVELDA Z. (2004): *Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new Century*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 42, pp. 415-437.
- SLEAT D.E., ZHANG L., PALUKAITIS P. (1994): *Mapping determinants within cucumber mosaic virus and its satellite RNA for the induction of necrosis in tomato plants*, «Mol. Plant-Microbe Interact.», 7, pp. 189-95.
- SMITH C.M., BOYKO E.V. (2007): *The molecular bases of plant resistance and defence responses to aphid feeding: current status*, «Entomol. Exp. Appl.», 122, pp. 1-16.
- THOMPSON, G.A., GOGGIN F.L. (2006): *Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects*, «J. Exp. Bot.», 57, pp. 755-766.
- VAKALOUNAKIS D.J., LATERROT H., MORETTI A., LIGOXIGAKIS E.K., SMARDAS K. (1997): *Linkage between Frl (Fusarium f. sp. radialis lycopersici resistance) and tm-2 (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (Lycopersicon esculentum)*, «Leading Edge Review Cell», 124, pp. 803-814.
- VAN WEES S.C., CHANG H.S., ZHU T., GLAZEBROOK J. (2003): *Characterization of the early response of Arabidopsis to Alternaria brassicicola infection using expression profiling*, «Plant Physiol.», 132, pp. 606-17.
- WAN J., DUNNING F.M., BENT A.F. (2002): *Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays*, «Funct. Integr. Genomics», 2, pp. 259-273.
- WHITHAM S.A., QUAN S., CHANG H.S., COOPER B., ESTES B., ZHU T., WANG X., HOU Y.M. (2003): *Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants*, «Plant J.», 33, pp. 271-83.
- WHITHAM S.A., WANG Y. (2004): *Roles for host factors in plant viral pathogenicity*, «Curr. Opin. Plant Biol.», 7, pp. 365-71.
- WISE R.P., MOSCOU M.J., BOGDANOVE A.J., WHITHAM S.A. (2007): *Transcript profiling in host-pathogen interactions*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 45, pp. 329-369.

L'endosperma di frumento: una fabbrica per l'assemblaggio di macromolecole proteiche

INTRODUZIONE

Il frumento è alla base dell'alimentazione di più di un terzo della popolazione mondiale (Orth e Shellenberger, 1988) ed è principalmente coltivato per le sue cariossidi. Di questo cereale sono coltivate soprattutto due specie allopoliploidi: *Triticum durum* Desf., tetraploide ($2n=28$), con genoma AABB, e *Triticum aestivum* L., esaploide ($2n=42$), con genoma AABBDD.

La cariosside matura è formata da tre parti fondamentali: il germe o embrione, la crusca e l'endosperma. L'endosperma rappresenta più dell'80% della massa della cariosside ed è rivestito esternamente da uno strato di cellule aleuroniche. L'embrione ("germe di grano") rappresenta invece circa il 3% della cariosside. La crusca è formata dagli strati di rivestimento della cariosside (pericarpo all'esterno e residui dei tegumenti seminali all'interno) e dallo strato di aleurone e rappresenta circa il 14% del frutto.

Nei cereali la cariosside è la sede di accumulo dei prodotti della fotosintesi e del metabolismo dell'azoto: contiene infatti una limitata quantità di proteine (7-15%) e di lipidi (2-9%) e ha un elevato contenuto di carboidrati (65-75%), accumulati principalmente sotto forma di amido.

L'estesa coltivazione del frumento su scala mondiale trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle relative cariossidi e nella grande versatilità degli impasti ottenuti mescolando la farina o la semola di frumento con acqua. Per quanto concerne il profilo nutrizionale, la cariosside di frumento è un'ottima fonte di carboidrati, essen-

* Cnr-Istituto di biologia e biotecnologia agraria, Milano

** Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli studi della Tuscia, Viterbo

do costituita per l'80% da amido e inoltre presenta un discreto contenuto di fibre, proteine, vitamine e minerali. Il contenuto proteico della cariosside di grano è compreso fra il 10% e il 18% del peso secco ma, come gran parte delle proteine di origine vegetale, le proteine di riserva del frumento sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali, quali la lisina e il triptofano.

LE PROTEINE DELLA CARIOSSIDE

La prima classificazione delle proteine di frumento è stata sviluppata da Osborne (1924) ed è basata sulla diversa solubilità delle proteine in vari solventi. Le proteine, quindi, possono essere classificate in:

- *albumine*, solubili in acqua;
- *globuline*, solubili in soluzioni saline;
- *gliadine*, solubili in soluzioni alcoliche;
- *glutenine*, solubili in acidi diluiti o alcali.

Le due ultime classi, gliadine e glutenine, costituiscono le proteine di riserva della cariosside. Queste proteine sono accumulate nell'endosperma durante la maturazione e rappresentano una fonte energetica di carbonio e azoto per l'embrione nelle fasi precoci di germinazione. Le proteine di riserva della cariosside conferiscono proprietà reologiche uniche agli impasti ottenuti con le farine di frumento, permettendone la lavorazione in una vasta gamma di prodotti, quali la pasta, il pane, il cous-cous, i biscotti e tanti altri e determinano, quindi, l'alto valore tecnologico che è proprio degli sfarinati di questo cereale.

Le proteine di riserva costituiscono il cosiddetto "glutine", ovvero la massa proteica viscoelastica che rimane dopo aver estratto con acqua le sostanze solubili (principalmente amido e proteine metaboliche) (Beccari, 1785).

La qualità e la quantità delle proteine costituenti il glutine sono i principali fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento e, in particolare, le proprietà visco-elastiche degli impasti. È generalmente accettato che le gliadine contribuiscano principalmente all'estensibilità dell'impasto, mentre le glutenine ne determinino la forza e l'elasticità (Shewry et al., 1997). Nel loro insieme, gliadine e glutenine rappresentano circa l'80% delle proteine della cariosside.

Le proprietà reologiche degli impasti di frumento sono in stretta relazione con le caratteristiche fisico-chimiche delle proteine costituenti il glutine, che si organizzano in un reticolo complesso stabilizzato da legami covalenti (legami disolfuro) e da legami di natura secondaria (legami a idrogeno e

di natura idrofobica) (Belton, 1999; Shewry et al., 2001). In particolare, mentre le glutenine sono proteine polimeriche le cui singole unità componenti sono unite fra di loro da legami disolfuro inter-molecolari, le gliadine sono proteine monomeriche che prendono parte alla formazione del glutine mediante legami idrogeno inter-catena, grazie ai numerosi residui di glutammina presenti, e mediante legami di natura idrofobica fra le catene non polari degli amminoacidi.

Gliadine

Le gliadine sono proteine monomeriche in quanto prive di residui cisteinici o in quanto tutte le cisteine presenti formano legami intra-molecolari. Inoltre, sono considerate il fattore principale che causa la malattia celiaca (Londei et al., 2005), la più comune intolleranza umana al glutine.

Le gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 25.000 e 50.000 e vengono tipicamente classificate in tre gruppi, α/β (o solo α), γ e ω -gliadine (Woychik et al., 1961), a seconda della loro mobilità elettroforetica su gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) (fig. 1). Le gliadine sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sul braccio corto dei cromosomi omeologhi dei gruppi 1 e 6 (Lafiandra et al., 1984). I *loci* che codificano per la maggior parte delle α -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 6 e sono indicati come *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*), mentre quelli codificanti la maggior parte delle γ e ω -gliadine sono localizzati sui cromosomi della serie 1 e sono indicati come *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*) (fig. 2).

Le α -gliadine hanno una struttura primaria caratterizzata dalla presenza di tre distinte regioni (fig. 3): un breve dominio N-terminale, un dominio centrale privo di cisteine (formato da ripetizioni di sequenze ricche in prolina e glutammica) e infine un lungo dominio C-terminale contenente i sei residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi. Le α -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 30.000 e 34.000.

Anche le γ -gliadine sono formate da tre distinte regioni (fig. 3): un breve dominio N-terminale, un dominio centrale ripetuto formato dalla ripetizione di una sequenza ricca in prolina e glutammina e infine un dominio C-terminale contenente gli otto residui di cisteina e la maggior parte degli amminoacidi carichi. Le γ -gliadine hanno un peso molecolare compreso fra 26.000 e 36.000 e hanno una composizione amminoacidica simile alle α -gliadine e alle subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS), sebbene differiscano considerevolmente nelle loro sequenze.

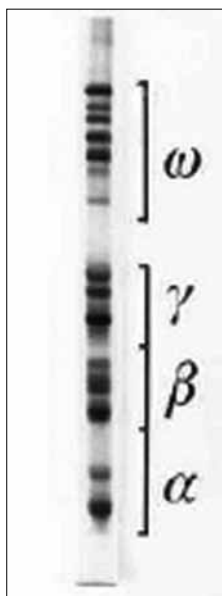


Fig. 1 Gel di poliacrilammide a pH acido (A-PAGE) di gliadine di frumento

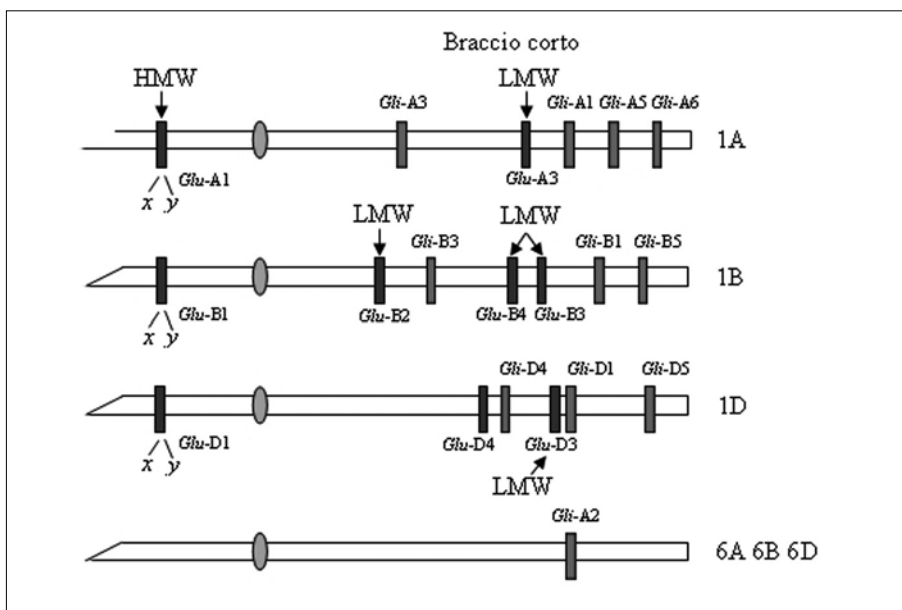


Fig. 2 Schema relativo alla localizzazione cromosomica dei geni codificanti le diverse proteine di riserva del frumento. I loci indicati dalle sigle HMW o LMW codificano rispettivamente per le HMW-GS (subunità gluteniniche ad alto peso molecolare) e LMW-GS (subunità gluteniniche a basso peso molecolare); tutti gli altri loci (compresi quelli minori) sono relativi alle gliadine. L'ovale corrisponde al centromero

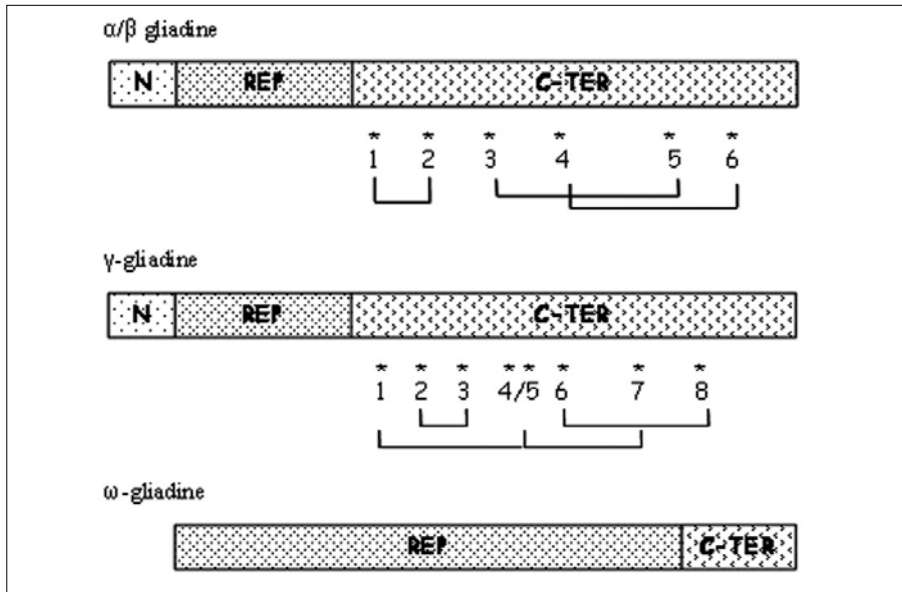


Fig. 3 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle α -, γ - e ω -gliadine. N, dominio N-terminale; REP, dominio ripetuto, C-TER, dominio C-terminale. Gli asterischi indicano la posizione dei residui cisteinici. Sono riportati inoltre i presunti ponti disolfuro intra-molecolari nelle α - e γ -gliadine

Infine, le ω -gliadine hanno un peso molecolare compreso tra 44.000 e 74.000 e mostrano una composizione amminoacidica e una struttura del tutto diversa da quella delle α - e γ -gliadine (fig. 3). Le ω -gliadine sono prive di residui di cisteina e sono costituite quasi esclusivamente da un dominio a sequenze ripetute, ricco in glutammina, acido glutammico, prolina e fenilalanina (Hsia and Anderson, 2001).

Glutenine

Le glutenine, o polimeri gluteninici, sono polimeri con un peso molecolare che può variare da 60.000 fino all'ordine del milione, costituendo uno dei polimeri proteici di maggiori dimensioni presenti in natura (Wrigley, 1996). Le dimensioni dei polimeri gluteninici costituiscono il fattore più importante nel determinare le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento. In particolare, maggiori sono le dimensioni di questi polimeri e migliori sono le caratteristiche di forza ed elasticità tipiche degli impasti (Weegels et al., 1996).

In seguito a riduzione dei ponti disolfuro inter- e intra-molecolari, le subunità gluteniniche possono essere separate su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) in due gruppi a diversa mobilità elettroforetica, costituiti da subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS) e subunità a basso peso molecolare (LMW-GS).

Le HMW-GS sono rappresentate da un numero ridotto di subunità che varia da 3 a 5 (raramente 6), mentre le LMW-GS sono molto più abbondanti ed eterogenee.

Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare

Nonostante rappresentino solo il 5-10% delle proteine totali nella cariosside matura, le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) costituiscono il gruppo di prolamine di frumento più ampiamente studiato. Le HMW-GS hanno un peso molecolare compreso tra 80.000 e 120.000 e, diversamente dalle altre proteine del frumento, hanno un alto contenuto in glicina e un più basso contenuto in prolina (Shewry et al., 1986).

Le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare sono codificate da geni i cui *loci* sono localizzati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A, 1B, 1D (Payne et al., 1981) e sono indicati come *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1*, e *Glu-D1*) (fig. 2). Ognuno di questi *loci* è costituito da due geni strettamente associati che codificano per due subunità proteiche con differente struttura e peso molecolare, denominate subunità *x* e *y*, rispettivamente a maggiore e minore peso molecolare. Tutte le cultivar di frumento tenero possiedono le subunità 1Bx, 1Dx, e 1Dy, mentre possono avere o non avere la subunità 1By e/o la 1Ax.

Le HMW-GS di tipo *x* e di tipo *y* sono costituite da tre domini, un dominio N-terminale di circa 100 residui, un dominio centrale di circa 400-600 residui, formato da una lunga serie di sequenze amminoacidiche ripetute e infine un breve dominio C-terminale, di circa 50 residui (fig. 4). Fondamentalmente, la differenza di grandezza tra le varie subunità è dovuta alla diversa estensione del dominio ripetuto e in particolare al diverso numero di ripetizioni presenti (D'Ovidio et al., 1995).

Una caratteristica delle HMW-GS è la presenza, in prossimità delle estremità N e C-terminali, di residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intra- e inter-molecolari. Le subunità di tipo *x* possiedono quattro residui di cisteina per catena polipeptidica, di cui tre localizzati nell'estremità N-terminale e uno nella sequenza C-terminale. Unica eccezione ad oggi nota, è rappresentata dalla subunità 1Dx5 che presenta, oltre alle quattro cisteine

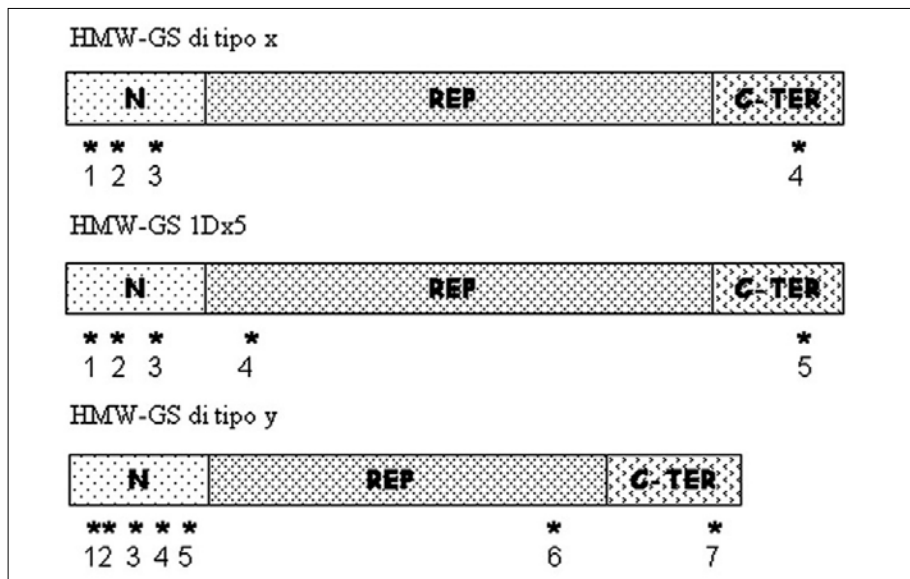


Fig. 4 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica delle HMW-GS di tipo x e di tipo y. È riportata, oltre alla struttura delle HMW-GS di tipo x canoniche (in alto), anche quella della subunità 1Dx5 (al centro) che presenta un'addizionale cisteina localizzata all'inizio del dominio ripetuto. I numeri indicano i residui di cisteina

tipiche delle subunità di tipo x, un addizionale residuo di cisteina localizzato nel dominio ripetuto, in prossimità della regione N-terminale. La subunità 1Dx5 è presente in varietà di frumento tenero le cui farine mostrano elevate qualità tecnologiche, in particolar modo per quanto riguarda i processi di panificazione.

Le subunità di tipo y possiedono sette residui cisteinici, di cui cinque localizzati nel dominio N-terminale e due in quello C-terminale.

Subunità gluteniniche a basso peso molecolare

Le subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW-GS) sono un gruppo di proteine molto vasto ed eterogeneo e per questo motivo la loro struttura, organizzazione e correlazione con i parametri qualitativi è a uno stadio di caratterizzazione ancora incompleto. In base alla loro mobilità elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), le LMW-GS sono state classificate in tre gruppi distinti, gruppo B, C e D (Payne e Corfield, 1979). Questa classificazione, inizialmente basata sulla diversa mobilità elettroforetica, riflette

di fatto le differenti caratteristiche biochimiche e strutturali dei polipeptidi (D'Ovidio e Masci, 2004).

Il gruppo D comprende subunità con peso molecolare di circa 40.000 e corrisponde a ω -gliadine modificate che hanno acquisito un residuo di cisteina in seguito a un evento di mutazione, tramite il quale prendono parte alla formazione dei polimeri gluteninici, formando legami inter-molecolari con le altre subunità (Masci et al., 1993; Masci et al., 1999).

Il gruppo C include almeno trenta proteine, con peso molecolare compreso tra 30.000 e 35.000, di cui la maggior parte corrisponde a gliadine di tipo α/β e γ , modificate nel numero e/o nella posizione dei residui cisteinici. In virtù di questa caratteristica, prendono parte alla formazione della frazione polimerica (aggregata), come anche le subunità appartenenti al gruppo D.

Infine il gruppo B include subunità con peso molecolare compreso tra 35.000 e 42.000 e a esso appartengono le LMW-GS propriamente dette. Queste, a loro volta sono state ulteriormente distinte in tre sottogruppi sulla base del primo residuo amminoacidico della sequenza polipeptidica matura, rispettivamente serina (LMW-s), metionina (LMW-m) e isoleucina (LMW-i). LMW-s e LMW-m sono le più abbondanti, mentre le LMW-i sono poco rappresentate e sono codificate principalmente (se non esclusivamente) da geni presenti sul braccio corto del cromosoma 1A (Muccilli et al., 2010).

Per quanto concerne la struttura polipeptidica, le LMW-s e LMW-m sono caratterizzate da pesi molecolari compresi fra 35.000 e 50.000 (LMW-s) e 30.000-40.000 (LMW-m), e sono organizzate in tre regioni distinte (fig. 5). La prima regione è costituita da 13-16 residui amminoacidici; la seconda è costituita da un dominio ripetuto ricco in prolina e glutamina; infine, il terzo dominio è caratterizzato da una regione C-terminale (D'Ovidio e Masci, 2004). Sia le LMW-s che le LMW-m contengono otto residui cisteinici, di cui il primo è presente nella corta regione N-terminale o all'inizio del dominio ripetuto, mentre i rimanenti sette sono situati nel dominio C-terminale. Il primo e il settimo residuo cisteinico sono verosimilmente coinvolti nella formazione di legami disolfuro inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche (fig. 5 e 6).

La sequenza N-terminale delle LMW-s corrisponde a SHIPGL-, mentre quella delle LMW-m è più variabile, includendo sequenze di tipo METSHIPGL-, METSRIPGL-, e METSCIPGL- (D'Ovidio e Masci, 2004). In alcuni sporadici casi è stata identificata la sequenza MENSHPGL- (Ikeda et al., 2006). LMW-m e LMW-s differiscono perciò essenzialmente per la presenza

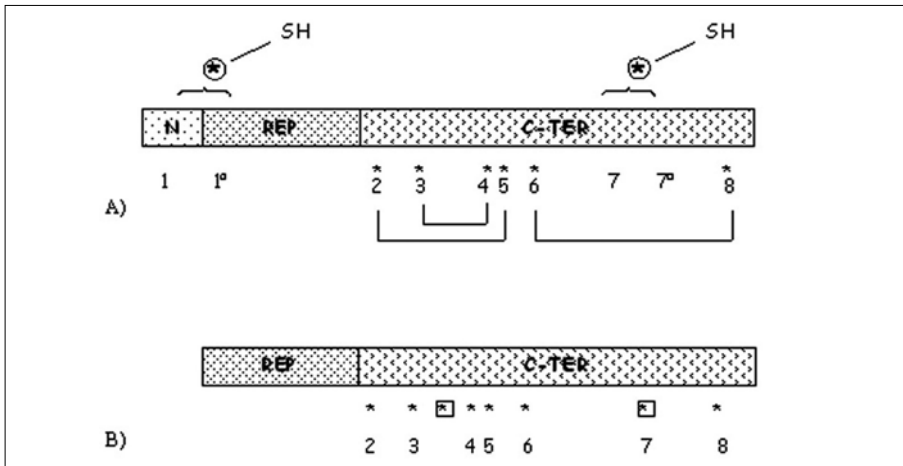


Fig. 5 Rappresentazione schematica della catena polipeptidica matura delle LMW-GS tipiche con particolare riferimento alla posizione delle cisteine. A, LMW-s e LMW-m; B, LMW-i. N, regione N-terminale; REP, dominio ripetuto; C-TER, regione C-terminale. Nel pannello A la posizione dei residui cisteinici è indicata da un asterisco, in particolare i residui 2, 3, 4, 5, 6 e 8 sono verosimilmente impegnati nella formazione di legami intra-molecolari, mentre i residui 1 e 7 (o quelli nelle posizioni alternative 1a e 7a) formano legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche. Nel pannello B, i probabili residui coinvolti nella formazione dei legami inter-molecolari sono indicati da un box

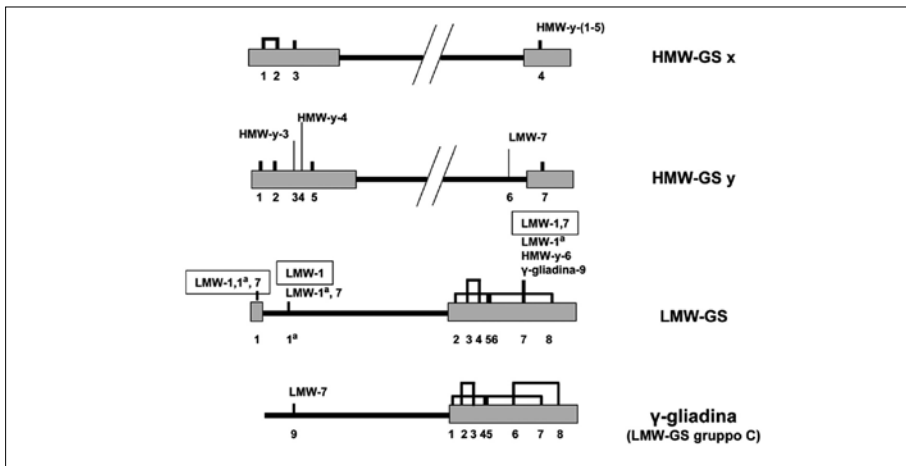


Fig. 6 Ponti disolfuro intercatena fra subunità gluteniniche. I ponti disolfuro intercatena che sono stati osservati mediante espressione di subunità gluteniniche in sistemi eterologhi sono indicati in un riquadro. Gli altri ponti disolfuro sono stati evidenziati mediante analisi diretta delle proteine del glutine. Nel caso della cisteina 4 delle HMW-GS di tipo x, non è stato determinato quale dei residui 1-5 delle subunità y sia implicato nella formazione di un disolfuro intercatena

TIPO DI LMW-GS	SEQUENZA N-TERMINALE
LMW-s	SHIPGL-
LMW-m	MET SHIPGL-
	MET SCIPGL-
	MET SRIPGL-
	MEN SHIPGL-

Tab. 1 *Confronto tra le sequenze amminoacidiche N-terminali delle sequenze LMW-GS di tipo s (LMW-s) e di tipo m (LMW-m). Si nota che i due gruppi differiscono principalmente per la presenza/assenza dei primi tre amminoacidi (MET o, raramente, MEN, in grassetto)*

nelle LMW-m dei primi tre amminoacidi MET (o MEN) (tab. 1). Questo ha indotto a ipotizzare che l'assenza dei primi tre amminoacidi nelle LMW-s sia dovuta alla rimozione della sequenza amminoacidica MEN, probabilmente per opera di una asparaginil endoproteasi (Masci et al., 1998). Un'ipotesi analoga era stata avanzata da Dupont et al. (2004) relativamente ad alcune ω -gliadine. Le asparaginil endoproteasi sono delle proteasi a cisteina, a localizzazione vacuolare, coinvolte nei processi di maturazione post-traduzionale di molte proteine di riserva (Gruis et al., 2002; Müntz e Shutov, 2002). Se questa ipotesi fosse confermata, il vacuolo sarebbe quindi il sito di maturazione delle LMW-GS.

Le LMW-i, pur presentando una struttura molto simile a quella delle LMW-m e LMW-s, mancano della breve regione N-terminale e la sequenza del polipeptide maturo inizia direttamente con il dominio ripetuto (fig. 5). Nonostante siano prive della regione N-terminale, nella quale è solitamente presente il primo residuo cisteinico, la presenza di un addizionale residuo tra la cisteina in posizione 3 e quella in posizione 4, fa sì che LMW-i mantengano inalterato il numero di cisteine caratteristico delle LMW-GS tipiche, che è pari a otto. Sebbene non ci siano dati certi circa l'organizzazione dei ponti disolfuro nelle LMW-i, in relazione alla posizione dei residui cisteinici rispetto a quella delle LMW-m e LMW-s, si ritiene che esse formino dei legami inter-molecolari con le altre subunità gluteniniche, tramite la cisteina aggiuntiva localizzata fra C3 e C4 e la cisteina in posizione 7, agendo pertanto da elementi di allungamento dei polimeri gluteninici (Cloutier et al., 2001).

Jackson et al. (1983) e Payne et al. (1984, 1985), hanno dimostrato che la maggior parte delle LMW-GS, sia di tipo B, che C che D sono codificate

da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi della serie 1, ovvero 1A, 1B e 1D, negli stessi *loci*, o strettamente associati, ai *loci* complessi *Gli-1* dove sono presenti i geni codificanti le γ e ω -gliadine (fig. 2). I *loci* per le LMW-GS sono stati designati come *Glu-3*. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che alcune LMW-GS di tipo C sono codificate da geni presenti sui bracci corti dei cromosomi del gruppo 6 (6A, 6B, 6D).

BIOSINTESI DELLE PROTEINE DI RISERVA DI FRUMENTO

L'endosperma di frumento è un tessuto specializzato nella biosintesi e nell'accumulo di diverse sostanze di riserva, in particolare di proteine, amido e lipidi. Le proteine di riserva sono accumulate all'interno del vacuolo, ma la loro biosintesi inizia sui polisomi legati alle membrane del reticolo endoplasmatico nel quale sono introdotte presumibilmente in maniera cotraduzionale (Greene, 1981). Successivamente sono trasportate, attraverso meccanismi diversi, al comparto vacuolare. Il reticolo endoplasmatico non è però un semplice sito di transito, ma piuttosto un comparto dove le proteine subiscono una serie di modificazioni che sono essenziali per la loro maturazione strutturale (Vitale e Ceriotti, 2004). Una delle principali funzioni del reticolo endoplasmatico è infatti quella di favorire il ripiegamento e, nel caso di proteine oligomeriche, l'assemblaggio delle proteine neosintetizzate. Questo comparto contiene numerosi fattori proteici che sono in grado di favorire la corretta maturazione strutturale delle proteine e che costituiscono il sistema ERAF (*Endoplasmic Reticulum Assisted Folding*). In generale, inoltre, le proteine neosintetizzate sono trattenute nel reticolo endoplasmatico finché non hanno completato la loro maturazione strutturale. La presenza di mutazioni, di errori nella trascrizione e traduzione, o nel ripiegamento della proteina, possono portare all'accumulo nel reticolo endoplasmatico di polipeptidi difettosi, che quindi non saranno trasportati fuori da questo comparto. L'eliminazione di queste proteine difettose avviene principalmente attraverso il cammino degradativo (ERAD, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), capace di riconoscere le proteine non ripiegate o ripiegate in maniera non corretta e di indirizzarle alla degradazione. Quindi, nel suo complesso, il reticolo endoplasmatico può essere considerato il comparto di ingresso del cammino di secrezione dove le proprietà intrinseche della proteina neosintetizzata (stabilità termodinamica, cinetica di ripiegamento) e l'attività dei sistemi di ripiegamento, degradazione e trasporto determinano il destino della proteina stessa (Wiseman et al., 2008).

Modificazioni co-traduzionali o post-traduzionali nella biosintesi delle proteine di riserva di frumento

Un evento precoce nella biosintesi delle proteine di riserva è la rimozione del peptide segnale, una sequenza N-terminale che ha la funzione di indirizzare la proteina nascente al reticolo endoplasmatico. La rimozione di questa sequenza avviene per opera di una peptidasi del segnale, che non è però stata caratterizzata in frumento. Nel caso di una LMW-GS, è stato mostrato che il ripiegamento *in vitro* della proteina, monitorato attraverso la formazione dei ponti disolfuro intracatena, non è influenzato negativamente dalla mancata rimozione del peptide segnale (Orsi et al., 2001). Tuttavia, un efficiente taglio del peptide segnale è necessario *in vivo* per il rilascio della proteina nel lume di questo comparto. In mais, mutazioni che bloccano il taglio del peptide segnale causano l'associazione dei polipeptidi zeinici mutati alle membrane del reticolo endoplasmatico, e scatenano una reazione di risposta conosciuta come *Unfolded Protein Response* (Gillikin et al., 1997).

Un'altra modificazione covalente a cui sono soggette molte proteine di riserva del frumento consiste nella formazione di ponti disolfuro intracatena e, nel caso della frazione polimerica, di ponti intercatena.

Le prolamine (la famiglia di proteine di riserva a cui appartengono gliadine e glutenine), insieme alle proteine 2S e agli inibitori dell' α -amilasi/tripsina dei cereali, sono caratterizzate dalla presenza di tre regioni conservate (A, B e C) che si pensa si siano originate dalla triplicazione di un dominio ancestrale, seguita da inserzioni e delezioni (Tatham et al., 1995; Shewry et al., 1999). Nelle prolamine ricche in zolfo (il gruppo di prolamine a cui appartengono le α/β - e γ -gliadine e le LMW-GS) queste tre regioni costituiscono buona parte del dominio C-terminale a sequenza non ripetuta, dove sono localizzati i ponti disolfuro intracatena (fig. 3 e 5). Un'analisi di 98 sequenze di prolamine ricche in zolfo di otto diverse specie di cereali ha evidenziato la conservazione quasi assoluta di quattro residui di cisteina che, in diversi membri di questo gruppo di proteine, sono coinvolti nella formazione di due ponti disolfuro intracatena (Ems-McClung et al., 2002). Questo alto livello di conservazione suggerisce che questi due ponti disolfuro abbiano un ruolo importante nella maturazione strutturale delle prolamine ricche in zolfo. Utilizzando un sistema di traduzione-traslocazione *in vitro* basato su componenti vegetali, è stato possibile evidenziare il ruolo fondamentale di uno di questi due ponti disolfuro nella maturazione strutturale di una LMW-GS. La formazione di questo ponte (che coinvolge le cisteine 2 e 5 delle LMW-GS, fig. 5A) è risultata essenziale per mantenere la proteina in uno stato monomerico, evitan-

done l'aggregazione (Orsi et al., 2001). Questo ponte è conservato non solo nelle prolamine ricche in zolfo, ma anche nelle albumine 2S e negli inibitori dell' α -amilasi/tripsina dei cereali. Al contrario, la formazione degli altri due ponti intracatena (coinvolgenti le cisteine 3 e 4 e 6 e 8, rispettivamente, fig. 5A) presenti nella LMW-GS non è risultata necessaria per evitare l'aggregazione della proteina neosintetizzata. Inoltre, successivi studi *in vivo* hanno dimostrato che questi due ultimi ponti disolfuro non sono necessari per permettere alla proteina di ripiegarsi in una conformazione compatibile con la polimerizzazione (Lombardi et al., 2009).

Nel loro complesso, questi risultati indicano che uno dei tre ponti disolfuro intracatena ha un ruolo fondamentale nel ripiegamento delle LMW-GS. Queste conclusioni sono in accordo con i risultati ottenuti con due altre proteine della famiglia delle prolamine. Mutazioni introdotte in residui di cisteina corrispondenti al residuo 5 delle LMW-GS (fig. 5A) hanno una chiara influenza sulla digeribilità di γ -zeina di mais (Lee e Hamaker, 2006), sulla solubilità di questa proteina quando è espressa in *Escherichia coli* (Ems-McClung et al., 2002) e sul trasporto intracellulare di una α -globulina di riso (Kawagoe et al., 2005). Questi risultati suggeriscono quindi che un ponte disolfuro altamente conservato nella famiglia delle prolamine abbia un ruolo importante nel ripiegamento di molte di queste proteine, e non solo delle LMW-GS.

Il ruolo dei ponti disolfuro intracatena nel ripiegamento delle HMW-GS non è stato ancora analizzato. Anche queste proteine, dal punto di vista strutturale, appartengono alla famiglia delle prolamine. Nelle HMW-GS una lunga sequenza ripetuta è interposta fra la regione B e la regione C. Un confronto fra i contesti di sequenza in cui sono inserite le cisteine presenti nelle HMW-GS e le prolamine ricche in zolfo di frumento (α/β -, γ -gliadine e LMW-GS) evidenzia delle similarità, a sostegno dell'ipotesi che i domini non ripetitivi di queste proteine siano evoluti da un progenitore ancestrale comune. Di particolare interesse è l'osservazione che le subunità di tipo γ contengono una coppia di cisteine appaiate (3 e 4 in fig. 4 e 6) poste in un contesto simile a quello della coppia di cisteine appaiate a cui appartiene la cisteina 5 nelle LMW-GS (fig. 5 e 6). Non pare tuttavia che, come nelle LMW-GS e nelle altre prolamine ricche in zolfo, il primo di questi due residui (3 in fig. 4 e 6) sia implicato nella formazione di un disolfuro intracatena. L'analisi di peptidi isolati dopo digestione triptica delle proteine del glutine ha rivelato la presenza di subunità di tipo γ associate mediante la formazione di due ponti disolfuro intercatena coinvolgenti le cisteine 3 e 4 (fig. 6) (Köhler et al., 1991), che quindi non sembrerebbero essere coinvolte nella formazione di ponti intracatena.

La regione N-terminale della subunità 1Bx7 contiene invece un singolo ponte disolfuro fra i residui 1 e 2 (fig. 6) (Köhler et al., 1993). Quale sia il ruolo di questo ponte disolfuro intracatena e se un ponte disolfuro analogo sia presente anche in altre HMW-GS non è stato chiarito. In ogni caso, le informazioni disponibili suggeriscono che, nonostante la conservazione della struttura AB nel dominio non ripetuto N-terminale delle HMW-GS, la mappa dei ponti disolfuro intracatena non sia riconducibile a quella che caratterizza le prolamine ricche in zolfo.

Organizzazione delle subunità nei polimeri gluteninici

Oltre a rivestire un ruolo importante nel ripiegamento di alcune prolamine, i ponti disolfuro svolgono un ruolo essenziale nella formazione dei polimeri gluteninici. Infatti una delle caratteristiche fondamentali che distinguono le proteine di riserva del frumento da quelle di altri cereali è la capacità di formare grandi polimeri che conferiscono agli impasti ottenuti dalle farine di questo cereale specifiche proprietà tecnologiche. Sebbene la formazione dei polimeri gluteninici abbia un ruolo fondamentale nel determinare la qualità delle farine, molti aspetti di questo processo non sono stati ancora chiariti. Analogamente, la struttura finale dei polimeri gluteninici rimane in gran parte oscura. Le difficoltà nel determinare la struttura di questi polimeri è in parte dovuta alle loro caratteristiche fisico-chimiche e alla loro complessità, essendo costituiti da un numero elevato di diverse subunità (HMW-GS, LMW-GS, gliadine aggregate). I dati finora disponibili sull'organizzazione delle singole subunità nei polimeri gluteninici sono stati ottenuti utilizzando essenzialmente tre diversi approcci: la riduzione parziale dei polimeri, l'identificazione di peptidi cistinici dopo digestione proteolitica del glutine e l'espressione di singole subunità gluteniniche in sistemi eterologhi.

La riduzione parziale di polimeri gluteninici porta all'accumulo prevalentemente di dimeri x - y , suggerendo che la formazione di ponti disolfuro fra subunità di tipo x e subunità di tipo y sia una caratteristica importante di questi polimeri proteici (Werner et al., 1992). Questa conclusione è corroborata dalla identificazione di un peptide cistinico in cui la regione C-terminale di una subunità di tipo x forma un ponte disolfuro con una delle cisteine presenti nella regione N-terminale di una subunità di tipo y (Tao et al., 1992). A conferma di quanto esposto, è stato riportato che una proteina ricombinante di fusione costituita dal dominio N-terminale della subunità 1Dy10 e dal dominio ripetuto e C-terminale della subunità 1Dx5, è presente principal-

mente in forma monomerica nell'endosperma di frumento (Shimoni et al., 1997). La presenza della proteina come monomero è dovuta alla formazione di un legame disolfuro intra-molecolare tra la cisteina presente nel dominio C-terminale della subunità 1Dx5 e una posta nel dominio N-terminale della subunità 1Dy10. Queste osservazioni dimostrano che esiste una marcata affinità tra il dominio N-terminale della subunità *y* e quello C-terminale della subunità *x*. Tuttavia, i risultati ottenuti mediante analisi di peptidi cistinici, che suggeriscono la presenza di legami intercatena fra subunità di tipo *y* (Köhler et al., 1991), insieme all'osservazione che sia subunità di tipo *x* che di tipo *y* possono essere incorporate in polimeri ad alto peso molecolare quando espresse in piante di tabacco (Shani et al., 1994), suggeriscono che le HMW-GS possano associarsi anche tramite la formazione di ponti disolfuro fra subunità dello stesso tipo (*x* o *y*).

Nel caso delle LMW-GS, l'analisi di peptidi cistinici derivati da digestione di proteine del glutine ha rivelato la presenza di quattro diversi legami disolfuro intercatena coinvolgenti le cisteine 1^a e 7 delle LMW-GS (fig. 6) (Keck et al., 1995). Questi risultati indicano che le LMW-GS possono associarsi sia fra loro, che con HMW-GS e gliadine aggregate (fig. 6).

Ulteriori dettagli sul meccanismo di assemblaggio delle LMW-GS sono stati ottenuti mediante espressione di queste proteine in sistemi eterologhi (Lombardi et al., 2009). Questi studi hanno evidenziato una bassa specificità nella formazione di ponti disolfuro intercatena durante l'assemblaggio di una LMW-GS. Questa subunità, contenendo due residui di cisteina che rimangono disponibili per la formazione di ponti disolfuro intercatena (1 e 7), può potenzialmente formare omopolimeri contenenti tre diversi tipi di legame (1-1, 1-7 e 7-7). La formazione di questi tre tipi di legame è stata in effetti osservata, indicando che lo stesso residuo di cisteina può formare un legame disolfuro con *partner* diversi. Inoltre, la coespressione di mutanti di due diverse LMW-GS (in cui i residui disponibili per la polimerizzazione erano 1 e 7 nella prima e 1^a e 7 nella seconda, vedi fig. 5) ha permesso di verificare la formazione di eterodimeri associati attraverso legami 1-1^a, 1-7, 1^a-7 e 7-7, vale a dire coinvolgenti tutte le possibili combinazioni dei quattro residui di cisteina presenti nelle proteine *wild-type* e non impegnati nella formazione di disolfuri intracatena (fig. 6). Nel loro complesso, questi risultati evidenziano un'importante caratteristica delle LMW-GS: il loro assemblaggio non è controllato da una rigida specificità nella formazione di ponti disolfuro intercatena e quindi consente potenzialmente la formazione di un numero molto elevato di polimeri diversi, non solo per lunghezza, ma anche per composizione e organizzazione delle subunità gluteniniche. Infine, l'analisi di peptidi

isolati dopo digestione enzimatica delle proteine del glutine ha evidenziato la presenza di un legame fra la cisteina 7 di una LMW-GS e la cisteina 6 di una HMW-GS di tipo γ (Keck et al., 1995).

Esistono svariati modelli molecolari ipotetici della struttura dei polimeri gluteninici di cui uno dei primi, proposto da Ewart (1979) e successivamente elaborato da Kasarda (1989), propone che le HMW-GS e le LMW-GS siano legate tra di loro casualmente, in modo più o meno lineare. Tale modello si basa sull'assunzione che ogni singola subunità gluteninica (HMW-GS e LMW-GS del gruppo B) sia in grado di formare solo due legami disolfuro con le altre subunità e, pertanto, l'incorporazione nel polimero in crescita di subunità in grado di formare un solo ponte disolfuro (come le LMW-GS appartenenti ai gruppi C e D), determinerebbe l'arresto della crescita del polimero. Sulla base di quanto esposto, secondo tale modello le dimensioni dei polimeri gluteninici dovrebbero variare in maniera lineare.

Alcune evidenze, come ad esempio l'esistenza di una subunità x delle HMW-GS (la subunità 1D α 5) che si suppone sia in grado di formare tre legami disolfuro inter-molecolari dando luogo a una ramificazione, non sono però in accordo con questo modello.

Nel 1985, Graveland et al. hanno proposto un differente modello secondo cui le subunità HMW-GS di tipo x e di tipo y sono unite in successione alternata da legami disolfuro a formare una catena lineare principale a cui associano le LMW-GS, formando ponti disolfuro con le HMW-GS di tipo y e andando a formare ramificazioni laterali. Secondo questo modello sono presenti uno o relativamente pochi polimeri gluteninici in quanto, in virtù dei numerosi punti di ramificazione presenti nel polimero gluteninico, l'incorporazione di un terminatore di catena non è in grado di arrestarne completamente la crescita. Sebbene il modello proposto da Graveland et al. (1985) tenga conto dell'affinità intrinseca fra le subunità di tipo x e quelle di tipo y , non dà spiegazione del fatto che le dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici, almeno quelle al di sotto del milione, varino linearmente.

In base a quanto esposto è evidente che, sia il modello proposto da Ewart, e successivamente elaborato da Kasarda, sia quello di Graveland presentano dei punti deboli. È verosimile che la reale struttura dei polimeri gluteninici sia rappresentata da una fusione elaborata di entrambi i modelli. In particolare, è possibile che una subunità di tipo x e una di tipo y si leghino tra di loro e che altre subunità (principalmente LMW-GS, ma anche HMW-GS e gliadine modificate) si leghino a loro volta a questo dimer (fig. 7). Tale modello potrebbe spiegare la variazione lineare delle dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici e anche la presenza di dimeri x - y e x - x .

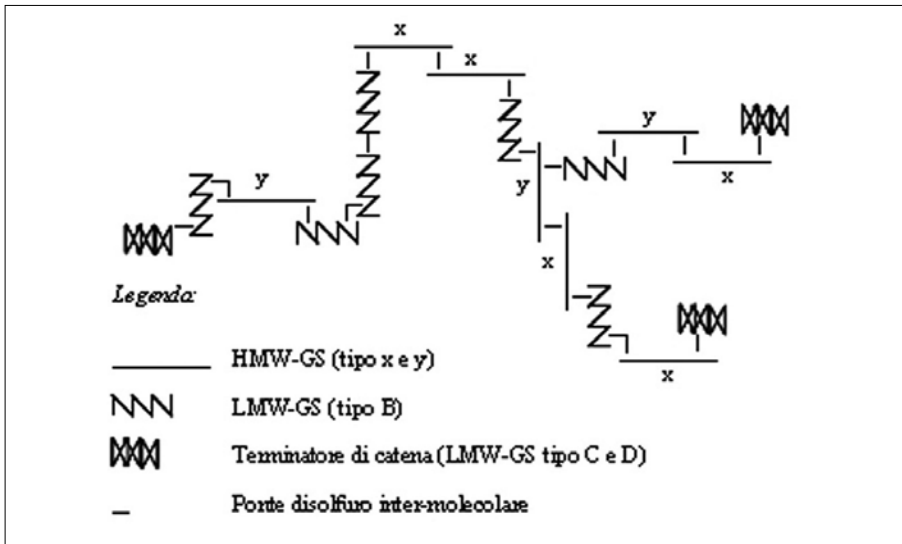


Fig. 7 Modello ipotetico della struttura dei polimeri gluteninici

Regolazione dell'assemblaggio delle subunità gluteniniche nel reticolo endoplasmatico

Se esistono dei modelli riguardo alla struttura dei polimeri gluteninici nel seme maturo, pochissimo è noto riguardo al processo di formazione dei polimeri stessi e non è chiaro come esso sia influenzato dalla struttura delle subunità gluteniniche e dall'andamento della loro sintesi durante lo sviluppo della cariosside. Le subunità gluteniniche sono sintetizzate fin dai primi stadi di sviluppo della cariosside, già da 7-10 giorni dopo la fioritura (Gupta et al., 1996; Scossa et al., 2008) e nello stesso periodo comincia il processo di polimerizzazione (Bushuk e Wrigley, 1971), che termina con la maturazione fisiologica. In particolare, è stato osservato che la formazione dei polimeri gluteninici di maggiori dimensioni comincia solo nei periodi tardivi dello sviluppo, all'incirca a 28 giorni dopo la fioritura, in concomitanza con il picco di accumulo delle subunità gluteniniche (Gupta et al., 1996). È stato suggerito che questo sia dovuto all'esistenza di una soglia di concentrazione dei monomeri e di oligomeri (che dovrebbe corrispondere a circa i 2/3 delle subunità totali), oltre la quale inizia il processo di formazione dei polimeri gluteninici di maggiori dimensioni, oppure che i meccanismi enzimatici necessari all'innesco di tale processo siano attivati a questo stadio (Gupta et al.,

1996). Dato che a questo stadio inizia il processo di essiccazione della carioside, è stato proposto che sia proprio questo fattore a innescare il processo di estensiva polimerizzazione (Carceller e Aussenac, 2001), forse perché aumenta di conseguenza la concentrazione dei monomeri e degli eventuali enzimi coinvolti. È tuttavia probabile che cambiamenti nella stato redox abbiano un ruolo importante in queste fasi finali del processo di polimerizzazione.

Un'analisi approfondita del processo di formazione dei polimeri glutenici potrebbe fornirci utili strumenti per capire come la struttura delle subunità gluteniniche, l'ambiente cellulare e l'ambiente esterno influenzino le proprietà fisico-chimiche e tecnologiche dei polimeri stessi. Tuttavia, le informazioni sui meccanismi che controllano il processo di polimerizzazione sono piuttosto scarse. Ad esempio non è chiaro quali siano i comparti subcellulari responsabili della formazione di questi polimeri, quale sia la fonte degli equivalenti ossidanti necessari per la formazione dei ponti disolfuro e se la loro formazione sia catalizzata *in vivo* da ossidoreduttasi.

In generale, la formazione di ponti disolfuro avviene a livello del reticolo endoplasmatico. Infatti, il reticolo endoplasmatico e lo spazio intermembrana dei mitocondri sono gli unici due comparti subcellulari nei quali è stato identificato un *pathway* ossidativo dedicato all'introduzione di ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate (Riemer et al., 2009). Studi effettuati su lievito e cellule di mammifero hanno portato all'identificazione di vari componenti di questo cammino ossidativo. In generale, la formazione dei ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate e inserite nel reticolo endoplasmatico avviene attraverso una reazione di scambio tiolo/disolfuro in cui un membro della famiglia delle ossidoreduttasi del reticolo endoplasmatico si riduce con la contestuale introduzione di un ponte disolfuro nella proteina. A sua volta, l'ossidoreduttasi è riossidata dall'enzima flavinico Ero1, che trasferisce gli elettroni attraverso una molecola di FAD all'ossigeno molecolare (Riemer et al., 2009) (fig. 8). In generale, si ritiene che la catalisi della formazione dei ponti disolfuro intercatena avvenga con gli stessi meccanismi. Nelle piante, il meccanismo di formazione dei ponti disolfuro nel reticolo endoplasmatico non è stato studiato in dettaglio. Tuttavia, l'analisi di cloni di cDNA e genomici e, più recentemente, dell'intero genoma di alcune piante ha rivelato la presenza di omologhi dei componenti che in lievito e mammiferi sono implicati nella introduzione di ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate (Ciaffi et al., 2001; Dixon et al., 2003; Houston et al., 2005; Ciaffi et al., 2006). Si può quindi ritenere che i meccanismi di formazione dei ponti disolfuro siano almeno in parte conservati. Nel genoma della pianta modello *Arabidopsis thaliana*, ad esempio, sono state identificate 19 sequenze codificanti per

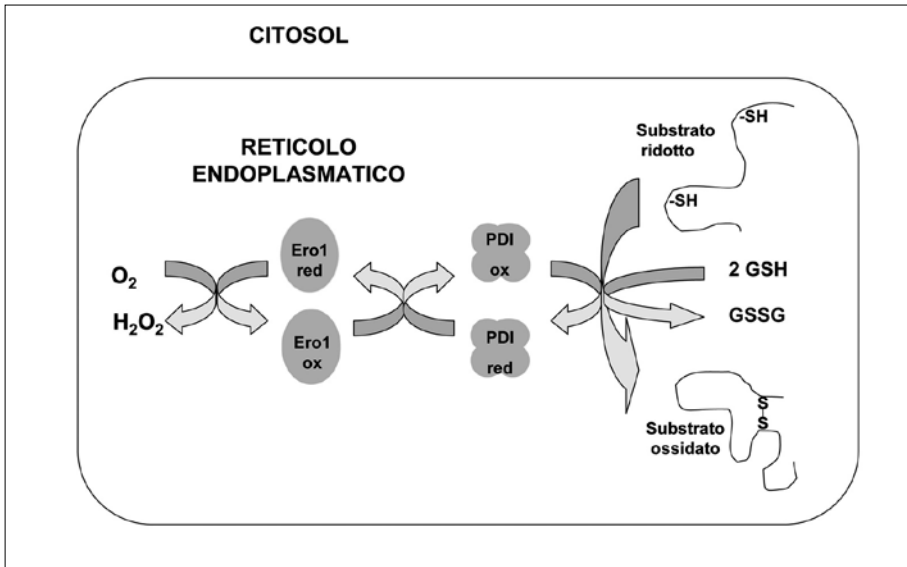


Fig. 8 *Formazione dei ponti disolfuro nel reticolo endoplasmatico. Il substrato è introdotto nel reticolo endoplasmatico sotto forma ridotta ed è ossidato per azione di uno o più componenti della famiglia delle proteina disolfuro isomerasi (PDI) attraverso reazioni di scambio tiolo/disolfuro. Sempre attraverso reazioni di scambio tiolo/disolfuro, PDI ridotta è riossidata da Ero1, mentre PDI nello stato ossidato può essere ridotta da glutathione ridotto (GSH), con formazione di glutathione ossidato (GSSG). Gli elettroni derivanti dai fenomeni di ossidazione sono trasferiti all'ossigeno con formazione di H_2O_2*

ossidoreduttasi potenzialmente localizzate nel cammino di secrezione (Houston et al., 2005; Lombardi e Ceriotti, dati non pubblicati). L'alto numero di ossidoreduttasi presenti nel reticolo endoplasmatico è probabilmente legato al grande numero di proteine diverse che vanno incontro a un ripiegamento ossidativo in questo comparto subcellulare e quindi alla necessità da parte della cellula di inserire ponti disolfuro in diversi moduli strutturali (Riemer et al., 2009). Il numero di geni di frumento che codificano per ossidoreduttasi potenzialmente localizzate nel cammino di secrezione rimane ancora da determinare, ma l'identificazione del ruolo delle singole ossidoreduttasi di frumento e della loro eventuale specificità costituisce un interessante campo di ricerca che potrebbe rivelare la presenza di enzimi specializzati nella formazione dei polimeri gluteninici.

Oltre a introdurre ponti disolfuro intra/intercatena, le ossidoreduttasi del reticolo endoplasmatico devono svolgere le funzioni di isomerasi e di reduttasi che sono necessarie, rispettivamente, per il ripiegamento di proteine nelle quali sono stati introdotti ponti disolfuro non nativi e per il de-ripiegamento

di proteine che devono essere inviate alla degradazione. Per svolgere queste funzioni le ossidoreduttasi devono essere mantenute in forma ridotta. Infatti, nelle cellule di mammifero, la maggior parte dei disolfuri che costituiscono i siti attivi nelle ossidoreduttasi di reticolo sono mantenuti in questa forma. Studi effettuati in lievito e cellule di mammifero hanno suggerito che la riduzione delle ossidoreduttasi di reticolo endoplasmatico può essere svolta da glutatione ridotto, prodotto nel citosol per opera dell'enzima glutatione reduttasi, che utilizza NADPH come fonte di equivalenti riducenti (Chakravarthi et al., 2006) (fig. 8). La presenza di disolfuri misti glutenine-glutatione è in relazione negativa con le dimensioni dei polimeri gluteninici e con la qualità delle farine (Li et al., 2004), suggerendo che il glutatione ridotto abbia un ruolo nel processo di polimerizzazione, dove potrebbe agire sia riducendo direttamente i polimeri gluteninici, sia mantenendo le ossidoreduttasi di reticolo endoplasmico in uno stato ridotto. Studi sull'attività del cammino ossidativo e sui livelli di glutatione durante la maturazione delle cariossidi di frumento potranno aiutarci a comprendere come la dimensione dei polimeri gluteninici possa essere controllata dallo stato fisiologico delle cellule dell'endosperma e dalle condizioni ambientali.

Studi effettuati in sistemi eterologhi indicano che alcuni eventi di polimerizzazione delle subunità gluteniniche possano effettivamente aver luogo nel reticolo endoplasmatico. Il sito di polimerizzazione di una LMW-GS espressa in protoplasti di tabacco è stata studiata mediante separazione degli organelli subcellulari su gradiente isopicnico di saccarosio (Lombardi et al., 2009). I risultati hanno confermato la presenza di polimeri nel reticolo endoplasmatico, suggerendo che anche in frumento la formazione dei polimeri gluteninici possa iniziare in questo comparto e quindi essere soggetta ai meccanismi regolativi sopra menzionati.

A differenza di altri cereali, dove le proteine di riserva sono accumulate, totalmente o in parte, nel reticolo endoplasmatico, le proteine di riserva del frumento sono trasportate e depositate nei vacuoli di riserva (Tosi et al., 2009). Dopo essere state trasportate in questo comparto, le subunità gluteniniche possono essere soggette a cambiamenti nello stato redox. Ad esempio, è stato evidenziato che durante le fasi di divisione e di espansione cellulare le subunità gluteniniche e in particolare le LMW-GS hanno un elevato contenuto in residui di cisteina ridotti, che vengono poi ossidati durante la fase di essiccazione (Rhazi et al., 2003). Questa fase di sviluppo della cariosside coincide con quella di accumulo della frazione polimerica non estraibile (UPP), che svolge un ruolo importante nel determinare le proprietà tecnologiche delle farine (Gupta et al., 1993). La probabile localizzazione vacuolare delle

proteine coinvolte in questi eventi suggerisce che questi processi ossidativi siano mediati da meccanismi diversi da quelli che potrebbero catalizzare la polimerizzazione delle subunità gluteniniche a livello del reticolo endoplasmatico.

CONCLUSIONI

L'intenso lavoro di caratterizzazione delle proteine di riserva di frumento ci ha permesso di comprendere le basi molecolari delle proprietà tecnologiche che caratterizzano le farine ottenute da questo cereale. Allo stesso tempo, le nostre conoscenze sulla struttura dei polimeri gluteninici e sui meccanismi della loro biosintesi sono ancora piuttosto limitate. I risultati finora ottenuti indicano che l'accumulo di questi polimeri coinvolge diversi comparti subcellulari ed è probabilmente regolato dai sistemi enzimatici che catalizzano la formazione dei ponti disolfuro. Gli studi sui meccanismi di biosintesi dei polimeri gluteninici ci permetteranno di individuare i fattori che ne controllano le dimensioni e la struttura e quindi di identificare i componenti cellulari da cui dipendono le caratteristiche tecnologiche delle farine.

RINGRAZIAMENTI

Il lavoro nei nostri laboratori è finanziato dal progetto MIUR-FAR "Agro-Gen - Laboratorio di GENomica per caratteri di importanza AGRONomica in frumento duro: identificazione di geni utili, analisi funzionale e selezione assistita con marcatori molecolari per lo sviluppo della filiera sementiera nazionale" e dal progetto CNR-Regione Lombardia "Risorse biologiche e tecnologie innovative per lo sviluppo sostenibile del sistema agro-alimentare".

RIASSUNTO

Le caratteristiche che rendono le farine di frumento diverse da quelle degli altri cereali sono principalmente dovute alla presenza nelle cariossidi di un insieme di macropolimeri proteici chiamati glutenine. Questi polimeri costituiscono, insieme alla frazione monomerica delle proteine di riserva, gran parte delle proteine del glutine, cioè della massa visco-elastica che si ottiene rimuovendo con acqua l'amido e le altre componenti solubili presenti nelle farine. La qualità e la quantità delle proteine del glutine sono i principali fattori che influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumen-

to. Negli ultimi decenni sono stati chiariti molti aspetti riguardanti le caratteristiche delle singole subunità gluteniniche. Le grandi dimensioni e le proprietà fisico-chimiche dei polimeri hanno invece ostacolato la loro caratterizzazione strutturale. Nonostante queste difficoltà, le informazioni finora raccolte hanno permesso di costruire alcuni modelli che descrivono la possibile organizzazione delle singole subunità all'interno dei polimeri gluteninici. Gli studi sui meccanismi di biosintesi delle glutenine hanno inoltre fornito alcune indicazioni sui meccanismi che controllano la struttura e le dimensioni dei polimeri e che quindi influenzano le caratteristiche tecnologiche delle farine di frumento.

ABSTRACT

The unique properties of wheat flours are mainly due to the presence of a set of polymeric proteins that accumulate in the caryopsis and that are collectively named glutenins. These protein polymers, together with the monomeric fraction of wheat storage proteins, are the main components of gluten, the visco-elastic mass that is obtained after water-soluble components, including starch, are removed from wheat flour. The quality and amount of gluten proteins are the main factors that control the technological properties of wheat flours. During the last decades, the characteristics of the individual glutenin subunits have been in part clarified. However, the large size and physical-chemical characteristics of the protein polymers have somehow hampered their precise structural characterization. Notwithstanding this, the information that has been collected has led to different hypothesis on the possible arrangement of individual subunits in the glutenin polymers. In addition, the studies on glutenin biosynthesis have started shedding light on the mechanisms that, by controlling the size and structure of these polymeric proteins, can potentially have an impact on the technological characteristics of wheat flours.

BIBLIOGRAFIA

- BECCARI G.B. (1785): *De frumento. «De Bononiensi Scientarium et Artium Instituto atque Academia Commentarii»*, tomo II-1, pp. 122-127.
- BELTON P.S. (1999): *On the elasticity of wheat gluten*, «Journal of Cereal Science», 29, pp. 103-107.
- BUSHUK W., WRIGLEY C.W. (1971): *Glutenin in developing wheat grain*, «Cereal Chemistry», 48, pp. 448-455.
- CARCELLER J.-L., AUSSÉNAC T. (2001): *SDS-insoluble glutenin polymer formation in developing grains of hexaploid wheat: The role of the ratio of high to low molecular weight glutenin subunits and drying rate during ripening*, «Functional Plant Biology», 28, pp. 193-201.
- CHAKRAVARTHI S., JESSOP C.E., BULLEID N.J. (2006): *The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress*, «EMBO Reports», 7, pp. 271-275.

- CIAFFI M., PAOLACCI A.R., DOMINICI L., TANZARELLA O.A., PORCEDDU E. (2001): *Molecular characterization of gene sequences coding for protein disulfide isomerase (PDI) in durum wheat* (*Triticum turgidum* ssp *durum*), «Gene», 265, pp. 147-156.
- CIAFFI M., PAOLACCI A.R., D'ALOISIO E., TANZARELLA O.A., PORCEDDU E. (2006): *Cloning and characterization of wheat PDI (protein disulfide isomerase) homoeologous genes and promoter sequences*, «Gene», 366, pp. 209-218.
- CLOUTIER S., RAMPITSCH C., PENNER G.A., LUKOW O.M. (2001): *Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene*, «Journal of Cereal Science», 33, pp. 143-154.
- DIXON D.P., VAN LITH M., EDWARDS R., BENHAM A. (2003): *Cloning and initial characterization of the Arabidopsis thaliana endoplasmic reticulum oxidoreductins*, «Antioxidants & Redox Signaling», 5, 389-396.
- D'OVIDIO R., MASCI S., PORCEDDU E. (1995): *Development of a set of oligonucleotides primers specific for genes at Glu-1 complex loci of wheat*, «Theoretical and Applied Genetics», 91, pp. 189-194.
- D'OVIDIO R., MASCI S. (2004): *The low-molecular-weight glutenin subunits*, «Journal of Cereal Science», 39, pp. 321-339.
- DUPONT F.M., VENSEL W., ENCARNACAO T., CHAN R., KASARDA D.D. (2004): *Similarities of omega gliadins from Triticum urartu to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing*, «Theoretical and Applied Genetics», 108, pp. 1299-1308.
- EMS-MCCLUNG S.C., BENMOUSSA M., HAINLINE B.E. (2002): *Mutational analysis of the maize gamma zein C-terminal cysteine residues*, «Plant Science», 162, pp. 131-141.
- EWART J.A.D. (1979): *Glutenin structure*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 30, pp. 482-492.
- GILLIKIN J.W., ZHANG F., COLEMAN C.E., BASS H.W., LARKINS B.A., BOSTON R.S. (1997): *A defective signal peptide tethers the flourey2 zein to the endoplasmic reticulum membrane*, «Plant Physiology», 114, 345-352.
- GRAVELAND A., BOSVELD P., LICHTENDONK W.J., MARSEILLE J.P., MOONEN J.H.E., SCHEEPSTRA A. (1985): *A model for the molecular structure of glutenins from wheat flour*, «Journal of Cereal Science», 3, pp. 1-16.
- GREENE F.C. (1981): *In vitro synthesis of wheat (Triticum aestivum L.) storage proteins*, «Plant Physiology», 68, pp. 778-783.
- GRUIS D., SELINGER D.A., CURRAN J.M., JUNG R. (2002): *Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases*, «Plant Cell», 14, pp. 2863-2882.
- GUPTA R.B., KHAN K., MACRITCHIE F. (1993): *Biochemical basis of flour properties in bread wheats. Effects of variation in the quality and size distribution of polymeric protein*, «Journal of Cereal Science», 18, pp. 23-41.
- GUPTA R.B., MASCI S., LAFIANDRA D., BARIANA H.S., MACRITCHIE F. (1996): *Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats*, «Journal of Experimental Botany», 47, pp. 1377-1385.
- HOUSTON N.L., FAN C.Z., XIANG Q.Y., SCHULZE J.M., JUNG R., BOSTON R.S. (2005): *Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins*, «Plant Physiology», 137, pp. 762-778.
- HSIA C.C., ANDERSON O.D. (2001): *Isolation and characterization of wheat omega gliadin genes*, «Theoretical and Applied Genetics», 103, pp. 37-44.

- IKEDA T.M., ARAKI E., FUJITA Y., YANO H. (2006): *Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit genes and their protein products in common wheats*, «Theoretical and Applied Genetics», 112, pp. 327-334.
- JACKSON E.A., HOLT L.M., PAYNE P.I. (1983): *Characterisation of high-molecular-weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and chromosomal localisation of their controlling genes*, «Theoretical and Applied Genetics», 66, pp. 29-37.
- KASARDA D.D. (1989): *Glutenin structure in relation to wheat quality*, in *Wheat is Unique*, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN. pp. 277-302.
- KAWAGOE Y., SUZUKI K., TASAKI M., YASUDA H., AKAGI K., KATOH E., NISHIZAWA N.K., OGAWA M., TAKAIWA F. (2005): *The critical role of disulfide bond formation in protein sorting in the endosperm of rice*, «The Plant Cell», 17, pp. 1141-1153.
- KECK B., KÖHLER P., WIESER H. (1995): *Disulphide bonds in wheat gluten. Cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung», 200, pp. 432-439.
- KÖHLER P., BELITZ H-D., WIESER H. (1991): *Disulfide bonds in wheat gluten: isolation of a cystine peptide from glutenin*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung», 192, pp. 234-239.
- KÖHLER P., BELITZ H-D., WIESER H. (1993): *Disulfide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins*, «Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung», 196, pp. 239-247.
- LAFIANDRA D., MORRIS R., KASARDA D.D. (1984): *Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin protein components of the cultivars Cheyenne and Chinese Spring by two-dimensional (two-pH) electrophoresis*, «Theoretical and Applied Genetics», 68, pp. 531-539.
- LEE S.H., HAMAKER B.R. (2006): *Cys155 of 27 kDa maize γ -zein is a key amino acid to improve its in vitro digestibility*, «FEBS Letters», 580, pp. 5803-5806.
- LI W., TSIAMI A.A., BOLLECKER S.S., SCHOFELD J.D. (2004): *Glutathione and related thiol compounds II. The importance of protein bound glutathione and related protein-bound compounds in gluten proteins*, «Journal of Cereal Science», 39, pp. 213-224.
- LOMBARDI A., BARBANTE A., DELLA CRISTINA P., ROSIELLO D., CASTELLAZZI C.L., SBANO L., MASCI S., CERIOTTI A. (2009): *A relaxed specificity in interchain disulfide bond formation characterizes the assembly of a low-molecular-weight glutenin subunit in the endoplasmic reticulum*, «Plant Physiology», 149, pp. 412-423.
- LONDEI M., CIACCI C., RICCIARELLI I., VACCA L., QUARANTINO S., MAIURI L. (2005): *Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease*, «Immunology», 42, pp. 913-918.
- MASCI S., LAFIANDRA D., PORCEDDU E., LEW E.J.-L., TAO H.P., KASARDA D.D. (1993): *D-glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine*, «Cereal Chemistry», 70, pp. 581-585.
- MASCI S., D'OVIDIO R., LAFIANDRA D., KASARDA D.D. (1998): *Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer*, «Plant Physiology», 118, pp. 1147-1158.
- MASCI S., EGOROV T.A., RONCHI C., KUZMICKY D.D., KASARDA D.D., LAFIANDRA D. (1999): *Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low molecular weight subunits of wheat glutenin*, «Journal of Cereal Science», 29, pp. 17-25.

- MUCCILLI V., CUNSOLO V., SALETTI R., FOTI S., MARGIOTTA B., SCOSSA F., MASCI S., LAFIANDRA D. (2010): *Characterisation of a specific class of typical low molecular weight glutenin subunits of durum wheat by a proteomic approach*, «Journal of Cereal Science», 51, pp. 134-139.
- MÜNTZ K., SHUTOV A.D. (2002): *Legumains and their functions in plants*, «Trends in Plant Science», 7, pp. 340-344.
- ORSI A., SPARVOLFI F., CERIOTTI A. (2001): *Role of individual disulfide bonds in the structural maturation of a low molecular weight glutenin subunit*, «Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 32322-32329.
- ORTH R.A., SHELLENBERGER J.A. (1988): *Origin, production and utilization of wheat*, in *Wheat Chemistry and Technology*, Ed. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, pp. 1-14.
- OSBORNE T.B. (1924): *The vegetable proteins*, Longmans, Green & Co., London, p. 154.
- PAYNE P.I., CORFIELD K.G. (1979): *Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium*, «Planta», 145, pp. 83-88.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., LAW C.N. (1981): *Structural and genetic studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. I. Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (Triticum aestivum)*, «Theoretical and Applied Genetics», 60, pp. 229-236.
- PAYNE P.I., JACKSON E.A., HOLT L.M., LAW C.N. (1984): *The genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat*, «Theoretical and Applied Genetics», 67, pp. 235-243.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., JARVIS M.G., JACKSON E.A. (1985): *Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (Triticum aestivum)*, Biochemical and genetic studies. «Cereal Chemistry», 62, pp. 319-326.
- RHAZI L., CAZALIS R., AUSSÉNAC T. (2003): *Sulphydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation*, «Journal of Cereal Science», 38, pp. 3-13.
- RIEMER J., BULLEID N.J., HERRMANN J.M. (2009): *Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process*, «Science», 324, pp. 1284-1287.
- SCOSSA F., LAUDENCIA-CHINGQUANCO D., ANDERSON O.D., VENSEL W.H., LAFIANDRA D., D'OVIDIO R., MASCI S. (2008): *Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line over-expressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm*, «Proteomics», 8, pp. 2948-2966.
- SHANI N., ROSENBERG N., KASARDA D.D., GALILI G. (1994): *Mechanism of assembly of wheat high-molecular-weight glutenin subunits inferred from expression of wild-type and mutant subunits in transgenic tobacco*, «Journal of Biological Chemistry», 269, pp. 8924-8930.
- SHEWRY P.R., TATHAM A.S., FORDE J., KREIS M., MIFLIN B.J. (1986): *The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment*, «Journal of Cereal Science», 4, pp. 97-106.
- SHEWRY P.R., NAPIER J.A., TATHAM A.S. (1995): *Seed storage proteins: structures and biosynthesis*, «The Plant Cell», 7, pp. 945-956.
- SHEWRY P.R., TATHAM A.S., LAZZERI P. (1997): *Biotechnology of wheat quality*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 73, pp. 397-406.
- SHEWRY P.R., POPINEAU Y., LAFIANDRA D., BELTON P. (2001): *Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project*, «Trends in Food Science and Technology», 11, pp. 433-441.

- SHIMONI Y., BLECHL A.E., ANDERSON O.D., GALILI G. (1997): *A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat*, «Journal of Biological Chemistry», 272, pp. 15488-15495.
- TAO H.P., ADALSTEINS A.E., KASARDA D.D. (1992): *Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1159, pp. 13-21.
- TOSI P., PARKER M., GRITSCH C.S., CARZANIGA R., MARTIN B., SHEWRY P. (2009): *Trafficking of storage proteins in developing grain of wheat*, «Journal of Experimental Botany», 60, pp. 979-991.
- VITALE A., CERIOTTI A. (2004): *Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests?*, «Plant Physiology» 136, pp. 3420-3426.
- WEEGELS P.L., HAMER R.J., SCHOFIELD J.D. (1996): *Functional properties of wheat glutenin*, «Journal of Cereal Science», 23, pp. 1-18.
- WISEMAN R.L., POWERS E.T., BUXBAUM J.N., KELLY J.W., BALCH W.E. (2008): *An adaptable standard for protein export from the endoplasmic reticulum*, «Cell», 131, pp. 809-821.
- WERNER W.E., ADALSTEIN A.E., KASARDA D.D. (1992): *Composition of high-molecular-weight glutenin subunit dimers formed by partial reduction of residue glutenin*, «Cereal Chemistry», 69, pp. 535-541.
- WOYCHIK J.H., BOUNDY J.A., DIMLER R.J. (1961): *Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea*, «Archives of Biochemistry and Biophysics», 94, pp. 477-482.
- WRIGLEY C.W. (1996): *Giant proteins with flour power*, «Nature», 381, pp. 738-739.

ROSA RAO*, GIANDOMENICO CORRADO*, STEFANO SFORZA**,
ROSANGELA MARCHELLI**

Tracciabilità dell'identità genetica nella filiera agro-alimentare del pomodoro

INTRODUZIONE

L'industria agro-alimentare italiana trae vantaggio dalla ampia disponibilità e diversità di specie orto-frutticole di pregio. Questi nostri materiali genetici, spesso non adeguatamente valorizzati e conosciuti, rappresentano una importante risorsa per incrementare la competitività del comparto agricolo italiano nei mercati internazionali. Inoltre, la crescente preferenza dei consumatori per alimenti salubri, tradizionali e sicuri fornisce una ulteriore opportunità all'agricoltura italiana per affermarsi anche sui mercati interni, tramite la valorizzazione dei cosiddetti prodotti tipici.

Il pomodoro è tra i prodotti ortivi simboli dell'agricoltura italiana. Il nostro paese è considerato, insieme alla Spagna, centro secondario di diversificazione della specie (Garcia-Martinez et al., 2006) e le favorevoli condizioni agro-climatiche dell'Italia hanno permesso lo sviluppo di un gran numero di varietà tradizionali locali. Queste comprendono varietà da mensa, a crescita indeterminata o a maturazione scalare, e varietà da industria, per la produzione di pelati, inscatolati, concentrati, con forma della bacca che varia dalla cilindrica alla piriforme, da quadrata ad allungata. Il pomodoro pelato rappresenta a tutt'oggi uno dei prodotti leader e simbolo dell'industria conserviera italiana, conosciuto e apprezzato in tutto il mondo per le sue pregevoli caratteristiche organolettiche, per il suo gusto ricco e la polpa succosa e consistente.

La creazione di marchi di qualità da parte della Unione Europea si è rivelata un efficace strumento per proteggere la tipicità dei prodotti alimentari e

* *Dip. Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II*

** *Dip. Chimica Organica ed Industriale, Università degli Studi di Parma*

rivitalizzare i comparti produttivi che includono produzioni tradizionali di pregio. Un tipico esempio dell'impatto del marchio DOP sulla rivitalizzazione della produzione è rappresentato proprio dal pomodoro 'San Marzano', il cui marchio DOP, riconosciuto dall'Unione Europea nel 1996 è curato da uno specifico Consorzio di tutela (www.consorziosanmarzano.it).

La coltivazione del 'San Marzano', infatti, ha subito negli anni Ottanta una importante riduzione, che è stata successivamente superata anche grazie all'attività di recupero, identificazione, moltiplicazione e valorizzazione della varietà 'San Marzano', effettuata dalla Regione Campania in collaborazione con l'Università degli Studi di Napoli Federico II.

La tutela dei marchi dei prodotti tipici e dell'indicazione di provenienza deve però necessariamente prevedere l'impiego di strumenti analitici affidabili, principalmente per evitare un uso indebito, anche ai soli fini pubblicitari, di un carattere distintivo della varietà da proteggere, quali il nome stesso, il suo luogo di origine o le sue peculiarità (ad esempio la forma e il colore del frutto). Tali strumenti analitici sono indispensabili soprattutto per prodotti processati industrialmente o impiegati come ingredienti di altri alimenti, in quanto i consumatori e la distribuzione molto difficilmente sono in grado di distinguere una denominazione indebitamente usata. Un uso improprio di una denominazione provoca infatti un doppio danno, determinando disorientamento della clientela, che non ritrova più nel prodotto acquistato le sue reali caratteristiche distintive, e sottraendo flussi commerciali alle imprese che legittimamente impiegano e sfruttano un determinato marchio o prodotto tipico.

Anche per rispondere a queste problematiche, la tracciabilità di filiera, è divenuta dal gennaio 2005 obbligatoria per tutte le aziende agro-alimentari. Essa è definita come "la capacità di rintracciare e seguire un alimento, un mangime, un animale produttore di alimenti o una sostanza attraverso tutti gli stadi della produzione e della distribuzione" (Reg. CE 178/2002). Il perseguimento della tracciabilità così definita include anche la tracciabilità genetica dei materiali vegetali. Tale attività è di vitale importanza soprattutto per la difesa e la tutela dei prodotti che sono utilizzati nelle filiere produttive che si fregiano di marchi collettivi (DOP, IGP, ecc).

MARCATORI MOLECOLARI PER LA DISCRIMINAZIONE DI VARIETÀ DI POMODORO E LA TRACCIABILITÀ GENETICA

L'analisi del DNA mediante i marcatori molecolari rappresenta un strumento di identificazione varietale che offre una maggiore affidabilità rispetto ai

metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici e biochimici, la cui utilità è limitata dall'influenza delle condizioni ambientali e dalle difficoltà di analisi dei prodotti processati. In primo luogo, anche se il DNA è comunque alterato dai vari processi di trasformazione (stress meccanico, riscaldamento) è più resistente e termostabile rispetto alle proteine e altri marcatori biochimici. Solitamente dalle matrici alimentari è ancora possibile isolare DNA di qualità adeguata per analisi PCR (Polymerase Chain Reaction) che forniscono informazioni sufficienti per l'identificazione varietale (Martinez et al., 2003). In secondo luogo, il DNA può essere potenzialmente estratto da qualsiasi matrice (incluso, ad esempio, il liquido di governo), perché è presente in pressoché tutte le cellule di un organismo. Inoltre, a causa della degenerazione del codice genetico e della presenza di regioni genomiche non codificanti, il DNA offre molte più informazioni rispetto alle proteine. Gli enormi progressi nel campo della biologia molecolare, stimolati dal settore clinico-diagnostico, hanno reso possibile l'identificazione di virtualmente tutte le specie animali da diversi tipi di substrato organico, come i muscoli, o il sangue (Lockley e Bardsley, 2000), mentre i progressi nel settore agro-alimentare sono limitati. È in ogni modo da sottolineare che le tecniche di rilevazione degli acidi nucleici costituiscono la base principale delle applicazioni forensiche (Scholetterer, 2004).

Per tutti questi motivi, si prevede che le analisi del DNA diventeranno parte integrante dei controlli delle filiere agro-alimentari.

La diversità molecolare di specie vegetali è stata, nel corso del tempo, caratterizzata mediante numerosi marcatori del DNA che evidenziano polimorfismi di vario livello informativo. Diversamente, per la tracciabilità genetica dei materiali vegetali nelle filiere agro-alimentare, i marcatori che meglio si prestano allo scopo sono gli SSR (Sequenze Semplici Ripetute) e gli SNP (Polimorfismi a Singolo Nucleotide). Entrambe queste tipologie di marcatori rilevano i polimorfismi presenti anche a partire da un DNA template frammentato o danneggiato, come spesso accade al DNA delle matrici alimentari soggette ai processi industriali. Gli SSR, marcatori di elezione per i test di paternità e studi forensi (Schlotterer, 2004), sono tra i più utili e affidabili marcatori molecolari del DNA in quanto possiedono elevati livelli di polimorfismo e sono codominanti; hanno inoltre il vantaggio di essere specie-specifici, e richiedono un corto DNA-stampo per l'amplificazione. Gli SNP, polimorfismi generati da mutazioni puntiformi, rappresentano la forma più comune di variazione molecolare. I principali vantaggi dell'uso di marcatori SNP risiedono nel fatto che essi sono molto numerosi e uniformemente distribuiti nel genoma e la loro analisi può essere facilmente automatizzata.

La costituzione del Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM) ha rappresentato una importante opportunità per sviluppare metodologie innovative per la certificazione dei materiali sementieri e dei prodotti della filiera pomodoro anche in relazione al controllo dell'identità dei materiali freschi e trasformati.

La variabilità genetica delle varietà coltivate di pomodoro è significativamente inferiore a quella riscontrata in altre specie auto-compatibili. Si ritiene che ciò sia la conseguenza oltre della stretta autogamia della specie, della utilizzazione di un ristretto pool di genotipi nei programmi di incrocio e selezione. Un marcatore dall'elevato potere discriminante è il minisatellite (GATA)₄ (Rao et al., 2006; Andreakis et al., 2004) che evidenzia un profilo genetico identificativo di ogni varietà o accessione analizzata e individua contaminazioni genetiche presenti in una stessa accessione (Caramante et al., 2009). Analogamente, il polimorfismo SSR ha evidenziato buoni livelli di diversità nel pomodoro coltivato, *S. lycopersicum* (Bredemeijer et al., 2002). Nell'ambito del progetto GenoPom è stato effettuato il *fingerprinting* del DNA di ecotipi e varietà tradizionali campane moltiplicate da una ditta sementiera che opera in Campania e di varietà commerciali incluse nel disciplinare di produzione integrata del pomodoro da industria, in uso presso una ditta di trasformazione campana. Sono stati selezionati 14 loci SSR particolarmente informativi della diversità intra-specifica. La discriminazione allelica è stata effettuata mediante elettroforesi capillare automatizzata su ABI Prism 3100-AVANT (Applied Biosystem). I dati ottenuti hanno mostrato che gli SSR utilizzati identificano tutti gli ecotipi e le varietà all'analisi. Il potere discriminante degli SSR si è rivelato simile a quello del (GATA)₄ (Caramante et al., 2009). Questi risultati indicano che, nonostante la limitata diversità genetica presente in pomodoro, il *fingerprinting* del DNA basato sugli SSR, discrimina non solo varietà differenti ma anche tipi morfologicamente simili e geneticamente vicini e può quindi essere utilizzato per la identificazione e la protezione di materiali geneticamente pregiati.

Anche se il loro livello di polimorfismo non sembra superare quello degli SSR, uno dei vantaggi dell'uso degli SNP è che i risultati ottenuti sono confrontabili anche se derivano da diversi approcci sperimentali. Questo aspetto rende tali marcatori potenzialmente utili per la tracciabilità genetica. Per questo motivo, sono stati validati diversi SNP di pomodoro, principalmente mediante analisi CAPS. L'obiettivo è l'identificazione di migliaia di SNP per la genotipizzazione e la successiva tracciabilità di cultivar di pomodoro nella filiera agro-alimentare con sistemi automatizzati di ultima generazione.

TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA POMODORO

Polimorfismi SSR

L'utilizzo dei marcatori molecolari del DNA per il controllo della filiera agro-alimentare del pomodoro ha la potenzialità di offrire una metodica sicura e rapida per l'accertamento dell'identità genetica delle cultivar presenti, nei vari segmenti della filiera agro-alimentare, dal prodotto fresco al prodotto finito. A tale scopo, particolarmente idonei risultano quei loci SSR che, pur mantenendo un elevato potere discriminante, sono caratterizzati da alleli di dimensioni intorno a 100 bp. Infatti, prove di amplificazione di differenti frammenti di una sequenza a singola copia del genoma di pomodoro, hanno dimostrato che è possibile amplificare solo sequenze di

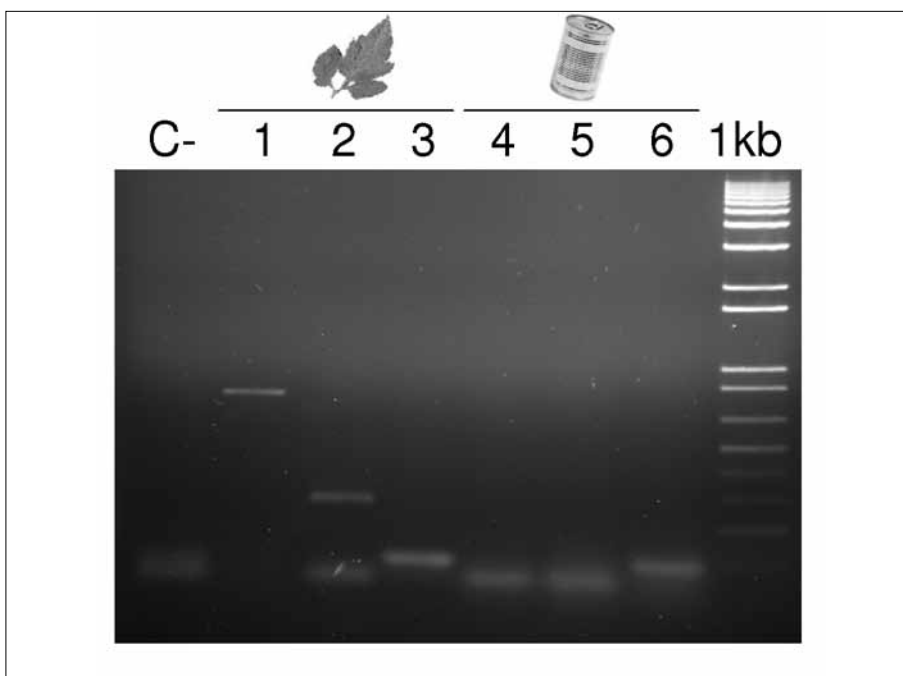


Fig. 1 Verifica dell'amplificabilità del DNA isolato da prodotti trasformati di pomodoro. 1, 2, 3: PCR con DNA isolato da foglia amplificato con coppie di primer che danno frammenti di circa 680 bp, 300 bp e 100 bp) di un gene target a singola copia, rispettivamente. 4, 5, 6: PCR con DNA isolato da prodotto processato amplificato con le coppie di primer che amplificano un prodotto di circa 680 bp, 300 bp e 100 bp, rispettivamente. C-= Controllo negativo. 1Kb = 1Kb plus ladder (Invitrogen)

dimensione ridotta, quando si impiega come stampo DNA estratto da pomodoro inscatolato, pelato o polpa (fig. 1). Questo risultato è la probabile conseguenza dell'elevato grado di frammentazione del DNA a seguito della trasformazione industriale. Similmente, le amplificazioni di alleli SSR a partire da DNA estratto da lavorati di pomodoro hanno evidenziato buoni risultati solo nel caso di alleli di dimensioni inferiori a 200 bp. I profili allelici dei loci SSR selezionati, ottenuti mediante elettroforesi capillare degli amplificati prodotti a partire da DNA estratto da foglia, bacca e prodotto processato di una filiera di pomodoro pelato, hanno mostrato completa corrispondenza (Rao et al., manoscritto in preparazione). Un esempio è riportato in figura 2. Questi risultati indicano che i marcatori SSR sono uno strumento adeguato per la tracciabilità genetica dei materiali nella filiera pomodoro.

Verso la costruzione di un array a PNA per la tracciabilità del pomodoro

L'uso dei polimorfismi SNPs per discriminare varietà di piante agrarie può avvenire utilizzando differenti tecnologie (Khlestkina et al., 2006). Tra le più efficienti vi sono senza dubbio quella basate sui microarray a DNA. Tuttavia le sonde a DNA presentano alcuni svantaggi: una forte dipendenza

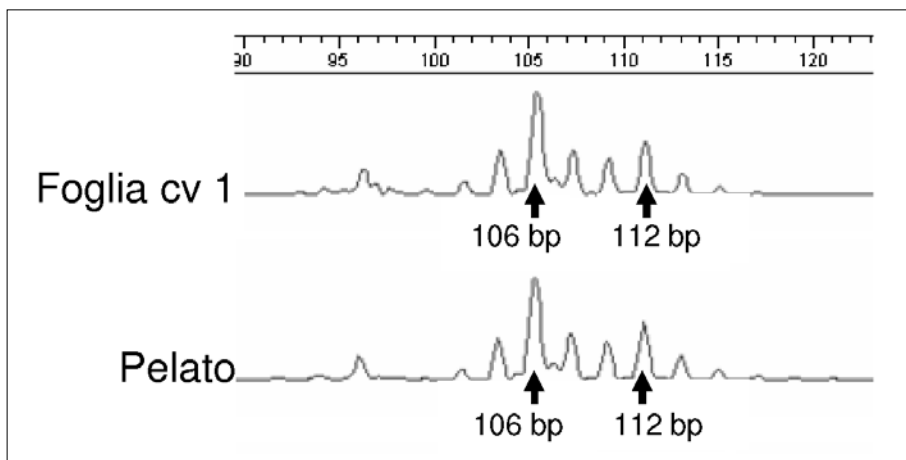


Fig. 2 *Profilo allelico di un locus SSR in un prodotto trasformato. Il DNA, isolato da foglia e dal prodotto trasformato, è stato amplificato con primer specifici per un locus SSR polimorfico. Il confronto tra i profili allelici a più loci SSR permette di distinguere e individuare le diverse varietà di pomodoro.*

dell'ibridazione dalla forza ionica, una non elevata stabilità chimica e una non perfetta specificità nel riconoscimento di sequenze contenenti un solo mismatch, come è il caso appunto negli SNPs. Tali svantaggi possono essere superati dall'uso di sonde a PNA (fig. 3a), analoghi oligonucleotidici a scheletro pseudopeptidico neutro. I PNA formano ibridi con sequenze di DNA complementari (in base ai classici appaiamenti di tipo Watson-Crick) di elevata stabilità, maggiore dei corrispondenti duplex DNA-DNA, in genere indipendenti dalla forza ionica e sono più specifici nel riconoscimento di mismatch. A questo si aggiunga che, in quanto pseudopeptidi, i PNA godono anche di un'elevata stabilità chimica. Per il riconoscimento di SNPs è inoltre possibile utilizzare PNA chirali derivati da ammino acidi con catene cariche positivamente (fig. 3b), che aumentano la specificità nel riconoscimento delle sequenze complementari di DNA (Sforza et al., 2000). I PNA possono proficuamente sostituire i DNA nella costruzione di arrays dedicati alla rivelazione di specifiche sequenze geniche, come già dimostrato nel caso della rivelazione

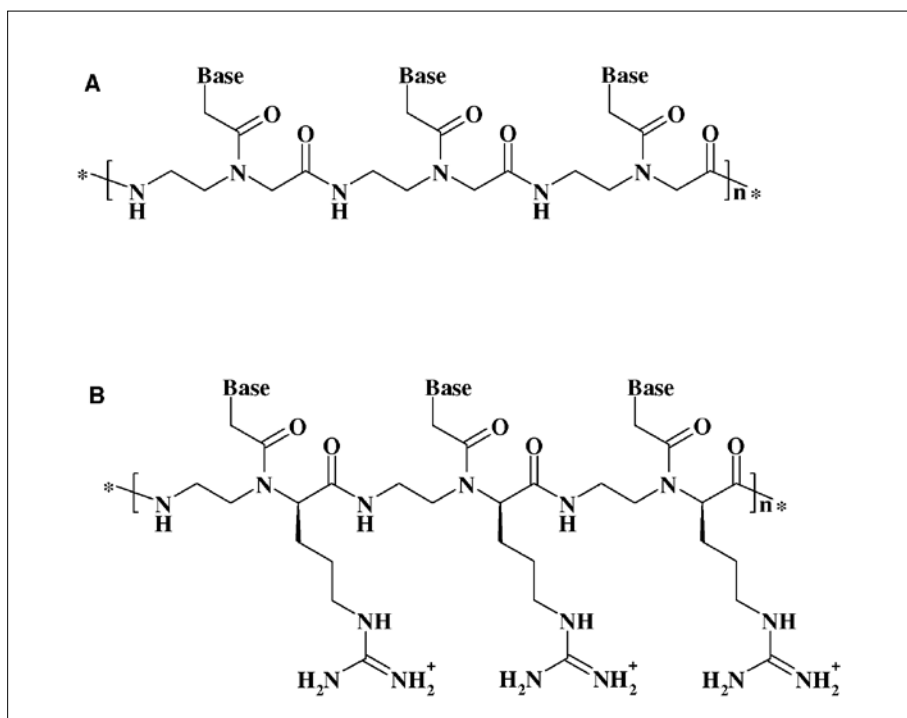


Fig. 3 Acido Peptido Nucleico (PNA) a struttura standard (a) e modificato con catene laterali derivate da D-arginina (b)

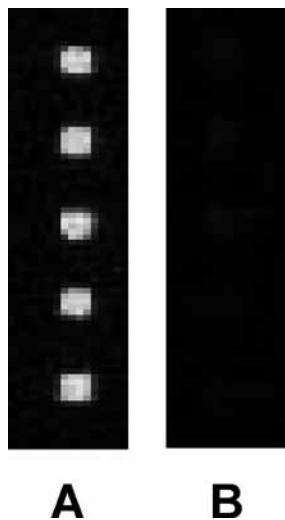


Fig. 4 Test preliminari con PNA array per la discriminazione delle varietà di pomodoro attraverso riconoscimento di SNP specifici. Risultati con DNA estratto da bacche di varietà Talent (a) e Leader (b)

di DNA proveniente da OGM o da allergeni nascosti (Rossi et al., 2006). Recentemente, è stato dimostrato che PNA modificati sono molto efficienti per la rivelazione di SNPs nel genoma umano mediante arrays dedicati (Calabretta et al., 2009).

Nell'ambito del progetto GenoPom sono stati progettati e sintetizzati sei PNA modificati per la sintesi di un test-array da utilizzarsi per la discriminazione di diverse varietà di pomodoro, mediante riconoscimento di SNPs specifici, in prodotti freschi e trasformati. Un esempio dei risultati ottenuti in esperimenti preliminari è mostrato in figura 4, dove è riportata la differenza di segnale ottenuta con DNA estratto da bacche di due varietà diverse.

CONCLUSIONI

I marcatori molecolari per la discriminazione degli organismi viventi sono principalmente impiegati in tre aree: tassonomia, ecologia e scienza forense. Tra queste, la scienza forense, e in particolare l'analisi in filiera, ha il maggior rilievo nel settore agro-alimentare. Le applicazioni delle tecniche di analisi del DNA includono l'identificazione di specie e varietà vegetali, di organismi contaminanti, di patogeni e di OGM. Due sono gli aspetti cruciali di queste applicazioni, ovvero il problema della frammentazione degli acidi nucleici nelle matrici processate e la necessità di sviluppare metodologie ad alta processività facilmente trasferibili e riproducibili tra i diversi laboratori. La nostra

attività di ricerca ha dimostrato che è possibile impiegare SSR e SNPs per la tracciabilità genetica di prodotti trasformati della filiera pomodoro.

Razze animali e varietà vegetali specificamente adattate a particolari ambienti sono le risorse fondamentali per rendere un prodotto tipico. Nel caso del pomodoro, questa importante biodiversità può essere conservata promuovendo la sostenibilità economica dei sistemi locali di coltivazione e trasformazione. Tale scopo deve essere innanzitutto perseguito con una adeguata protezione giuridica che include lo sviluppo di marchi di qualità e degli strumenti analitici per la loro difesa. In questa prospettiva, le nostre attività di ricerca non solo confermano che i marcatori molecolari del DNA sono uno strumento efficace per proteggere e distinguere i prodotti di qualità (Melchiade et al., 2007; Rao et al., 2006), ma indicano anche che alcuni marcatori possono essere impiegati con successo per l'identificazione genetica dei materiali di filiera. Noi ci auguriamo che la tutela dei prodotti tipici da parte delle istituzioni regionali e nazionali includa anche indagini molecolari, prima e dopo l'istituzione dei marchi di qualità.

RIASSUNTO

Il rispetto della normativa europea sull'etichettatura dei prodotti alimentari e l'esigenza di proteggere da sostituzioni fraudolente i prodotti tipici rappresentano due importanti motivazioni per lo sviluppo di metodi di autenticazione dell'identità genetica dei prodotti di filiera. In questo lavoro si presentano e si discutono applicazioni dei marcatori del DNA per la tracciabilità dei prodotti in ingresso ed in uscita della filiera agro alimentare del pomodoro. I risultati indicano che alcuni marcatori del DNA basati sulla PCR rappresentano uno strumento versatile ed innovativo per identificare le varietà impiegate nella produzione degli inscatolati di pomodoro, nonostante il DNA isolato dalle matrici alimentari sia altamente degradato. È probabile che le tecniche basate sul DNA saranno un approccio sempre più diffuso per identificare le varietà e le specie vegetali sia in prodotti singoli che miscele, in quanto tali tecniche sono facili da impiegare, affidabili, informative e ben si prestano ad analisi quantitative e ad alta processività.

ABSTRACT

Compliance with the European legislation on food labelling and the demand of protection for typical products against fraudulent substitutions are two major reasons that prompted the development of analytical methods for the authentication of the genetic identity in agro-food chains. In this work we show and discuss some applications of DNA markers for the traceability of products entering and the tomato food chain. The results indicated that some PCR-based DNA markers can be used as an innovative and

versatile tool for identifying the varieties used in the production of tinned tomatoes, despite the DNA isolated from the food matrix is highly degraded. It is likely that the DNA-based techniques will be an increasingly popular approach to identify crop varieties and species, in both single and mixed products, as these techniques are easy to use, reliable, informative and amenable to quantitative and high-throughput analysis.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREAKIS N., GIORDANO I., PENTANGELO A., FOGLIANO V., GRAZIANI G., MONTI L.M., RAO R. (2004): *DNA fingerprinting and quality traits of corbarino cherry-like tomato landraces*, «J. Agric. Food Chem.», 52, pp. 3366-3371.
- BREDEMEIJER G.M.M., COOKE R.J., GANAL M.W., PEETERS R., ISAAC P., NOORDIJK Y., RENDELL S., JACKSON J., RÖDER M.S., WENDEHAKKE K., DIJCKS M., AMELAINE M., WICKAERT V., BERTRAND L., VOSMAN B. (2002): *Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties*, «Theor. Appl. Genet.», 105, pp. 1019-1026.
- CALABRETTA A., TEDESCHI T., DI COLA G., CORRADINI R., SFORZA S., MARCHELLI R. (2009): *Arginine-based PNA microarrays for APOE genotyping*, «Mol. Biosyst.», 5, pp. 1323-1330.
- CARAMANTE M., RAO R., MONTI L.M., CORRADO G. (2009): *Discrimination of 'San Marzano' accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits*, «Sci. Hort.», 120, pp. 560-564.
- GARCÍA-MARTÍNEZ S., ANDREANI L., GARCÍA-GUSANO M., GEUNA F., RUIZ J.J. (2006): *Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars*, «Genome», 49, pp. 648-656.
- GERMINI A., ROSSI S., ZANETTI A., CORRADINI R., FOGHER C., MARCHELLI R. (2005): *Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food*, «J. Food Chem.», 53, pp. 3958-3962.
- KHLESTKINA E.K., SALINA E.A. (2006): *SNP markers: Methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat*, «Russ. J. Genet.», 42, pp. 585-594.
- MARTINEZ I., BATHEN T., STANDAL I.B. (2003): *Destructive and non destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs*, «Trends Food Sci. Technol.», 14, pp. 489-498.
- RAO R., CORRADO G., BIANCHI M., DI MAURO A. (2006): *(GATA)(4) DNA fingerprinting identifies morphologically characterized 'San Marzano' tomato plants*, «Plant Breeding», 125, pp. 173-176.
- ROSSI S., SCARAVELLI E., GERMINI A., CORRADINI R., FOGHER C., MARCHELLI R. (2006): *A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in foodstuffs*, «European Food Research and Technologies», 223, pp. 1-6.
- SCHLOTTERER C. (2004): *The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?*, «Nature Rev Genet», 5, pp. 63-69.
- SFORZA S., CORRADINI R., GHIRARDI S., DOSSENA A., MARCHELLI R. (2000): *DNA binding of a D-lysine-based chiral PNA: direction control and mismatch recognition*, «Eur. J. Org. Chem.», pp. 2905-2913.

ANTONIO MORETTI*, STEFANIA SOMMA*, GIUSEPPINA MULÈ*,
CATERINA MORCIA**, MARTINA SPINI**, MICHELE A. STANCA***,
VALERIA TERZI**

Biodiversità delle specie di *Fusarium* tossinogeniche coinvolte nella fusariosi della spiga di frumento duro: patogenicità, genetica, tossicità

INTRODUZIONE

Nell'ultima decade si è assistito a un significativo incremento delle manifestazioni associate alla presenza di patogeni fungini produttori di micotossine nelle coltivazioni cerealicole a livello mondiale (Goswami e Kistler, 2004). La conseguenza di tale diffusione è la contaminazione da micotossine nei cereali che rappresenta un serio rischio alimentare sia per il genere umano sia per gli animali in allevamento. La loro formazione nelle colture contaminate e la loro persistenza in alimenti e mangimi può essere, infatti, spesso associata a diversi tipi di malattia, fra cui l'induzione di varie forme di cancro, mutazioni genetiche e disordini estrogenici, gastrointestinali, urogenitali, vascolari, renali e nervosi. Alcune tossine, inoltre, possono compromettere il sistema immunitario e, quindi, ridurre la resistenza alle malattie. Inoltre, perdite economiche significative sono correlate all'impatto delle micotossine sulla salute umana, sulla produttività degli allevamenti e sul commercio nazionale e internazionale. Si stima che il 25% delle colture agroalimentari a livello mondiale, tra cui molti alimenti di base, siano contaminati da funghi micotossigeni, con la possibilità che le contaminazioni a carico dei cereali siano ancora più pesanti (CAST, 2003). In particolare, il frumento è una coltura che può essere generalmente contaminata da tre fra i cinque più importanti funghi produttori di micotossine: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *Fusarium graminearum* (Marasas et al., 2008). Pertanto, tre delle micotossine più im-

* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR-BARI

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

*** Facoltà di Agraria, Università di Modena e Reggio Emilia

portanti presenti naturalmente nei prodotti agricoli, ocratossina (prodotta da *A. ochraceus* e *P. verrucosum*), deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA, entrambi prodotti da *F. graminearum*) possono essere comuni contaminanti del frumento (Miller et al., 1995). Inoltre, la contaminazione da micotossine può estendersi oltre la fase di campo, protrahendosi al magazzino, durante lo stoccaggio, e alle diverse fasi di trasformazione da parte delle industrie agro-alimentari. Fra gli aspetti fondamentali della presenza di micotossine nelle derrate, particolare importanza assume la generale stabilità di questi composti che rende insufficienti, ai fini della decontaminazione e/o detossificazione, i normali processi impiegati nelle industrie alimentari quali, ad esempio, i trattamenti fisici (calore), chimici (raffinazione) e biologici (fermentazione). Pertanto, una volta presenti nella materia prima in lavorazione tali composti tossici permangono attivi, in percentuale variabile secondo il tipo di micotossina, lungo tutto il ciclo produttivo (Abecassis e Feillet, 2003).

LA FUSARIOSI DELLA SPIGA DI FRUMENTO E RELATIVE MICOTOSSINE

I frumenti (*Triticum aestivum* e *Triticum durum*) sono colture soggette all'attacco di numerose fitopatie di origine fungina, tra cui la fusariosi della spiga (FSF) è frequentemente ricorrente in Italia (Pasquini e Delogu, 2005). La FSF è ritenuta a livello mondiale una delle più gravi malattie fungine trasmesse per seme, in quanto causa di forti perdite di produzione e danni qualitativi: l'infezione compromette infatti il buon riempimento della cariosside con consistenti cali produttivi e può indurre lo sviluppo di pericolose micotossine con conseguente contaminazione delle farine e dei prodotti derivati. Questa malattia fungina, descritta per la prima volta alla fine del 1800 nei Paesi del Nord Europa, ha avuto una diffusione esponenziale durante l'ultimo secolo (Stack, 2003), espandendosi in Asia, Canada, Europa e Sud America, come riportato dal CIMMYT. I funghi del genere *Fusarium* sono in grado di colonizzare la spiga a partire dalla fine della spigatura fino allo stadio di maturazione latteo-cerosa della cariosside; il periodo di maggiore suscettibilità alla FSF coincide con quello corrispondente all'antesi, durante il quale specifiche sostanze come la betaina e la colina, stimolanti la germinazione delle spore del micete, vengono fornite dal polline del fiore. L'espandersi dell'invasione del saprofita dal fiore ai tessuti conduttori del rachide può portare al conseguente disseccamento delle spighe (Pancaldi e Alberti, 2001). La colonizzazione della granella da parte di questi patogeni può danneggiare seriamente la qualità del seme a causa della distruzione dei granuli di amido, delle pareti cellulari

e delle proteine di riserva con una conseguente drastica diminuzione della capacità germinativa del seme stesso (Bechtel et al., 1985).

Il principale agente causale della FSF è *F. graminearum* (teleomorfo, *Gibberella zeae*), una specie descritta recentemente come un complesso di specie, a seguito di una profonda revisione tassonomica eseguita in base a studi filogenetici. Inoltre, molte altre specie di *Fusarium* sono state associate alla malattia. In particolare, in Europa e in Italia, diverse indagini hanno permesso di associare alla FSF soprattutto *F. avenaceum*, *F. culmorum* e *F. poae*; in misura minore sono state associate *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* e *F. tricinctum*. Oltre a causare notevoli perdite di efficienza, le specie di *Fusarium* che causano la FSF possono accumulare nei cereali infetti, in determinate condizioni ambientali, le relative micotossine (Logrieco e Moretti, 2008). L'importanza di individuare con la massima cura possibile le specie coinvolte nella FSF è determinata anche dal fatto che la capacità tossinogenica degli agenti patogeni della fusariosi può essere estremamente specifica e cambiare dunque notevolmente non solo da una specie all'altra, ma anche all'interno di una stessa specie (Desjardins, 2006). Infatti, per quanto riguarda le specie principali, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*, ciascuna può produrre una gamma specifica di tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica (vedi paragrafo successivo), mentre *F. avenaceum* e *F. tricinctum* sono noti per la produzione di moniliformina, beauvericina ed enniatine, metaboliti di minore tossicità rispetto ai tricoteceni (Desjardins, 2006). Pertanto, le conseguenze della FSF sul consumo animale e umano dei cereali contaminati possono variare notevolmente a seconda della distribuzione e della predominanza delle diverse specie di *Fusarium* che si alternano sul frumento. A tale riguardo, occorre sottolineare come la diffusione di specie tossinogeniche di *Fusarium* sia determinata soprattutto dai fattori climatici, in particolare temperatura e umidità, e da fattori agronomici, quali rotazioni colturali, lavorazioni, fertilizzazioni e trattamenti fungicidi (Jennings et al., 2004). In particolare, pratiche colturali come la permanenza di residui vegetali invernali della coltivazione precedente, possono favorire l'infezione di *F. graminearum* attraverso le ascospore, spore germinative di origine sessuale, che quindi svolgono un ruolo importante nel predominio di tale agente patogeno nell'infezione dell'anno successivo. Tuttavia, sulle spighe di grano si possono spesso ritrovare combinazioni di *Fusarium* patogeni che co-abitano e possono avere un effetto sinergico nel determinare l'insorgenza dei sintomi della FSF. È molto interessante sottolineare anche che l'impatto dell'ambiente nel condizionare il tipo di associazionismo fra le specie di *Fusarium* nell'attaccare il frumento, la loro eventuale rotazione

sulle piante infette o anche la loro competizione, sono aspetti ancora poco chiariti.

Le piante di grano sono più suscettibili alla malattia durante l'antesi ed è collettivamente accettato che la fusariosi risulta più acuta quando condizioni meteorologiche caratterizzate da caldo e umido prevalgono durante l'antesi. Tuttavia, vi sono ancora dati insufficienti per comprendere l'impatto delle condizioni ambientali sulle singole specie agenti della fusariosi e su come e quanto questi parametri possano anche influenzare la produzione delle micotossine associate alle singole specie. È molto importante, dunque, conoscere la diffusione delle singole specie anche durante ogni singola fase di sviluppo del frumento, poiché è stato dimostrato che le diverse condizioni ambientali nelle diverse fasi fenologiche possono determinare una evoluzione del profilo delle specie di *Fusarium* presenti in ogni singola fase, con conseguente cambiamento del rischio micotossicologico collegato (Xu et al., 2005). Alla luce di quanto riportato finora, appare evidente come sia essenziale capire l'esatta natura della FSF, attraverso una identificazione accurata delle specie coinvolte, della loro epidemiologia e delle loro "esigenze" ambientali, sia per una previsione e gestione più affidabile della malattia, sia per la gestione dei rischi alimentari connessi alla contaminazione da micotossine del frumento.

Occorre, infine sottolineare come la presenza negli alimenti a base cerealicola di micotossine da *Fusarium* considerate più dannose dall'Unione Europea, sono regolate dal Regolamento CE N. 1126/2007 del 28 settembre 2007 (tab. 1).

I tricoteceni. I tricoteceni sono le micotossine prodotte da *Fusarium* che causano maggiori preoccupazioni nella catena alimentare legata al frumento, a causa della loro presenza nelle piante già in campo come contaminanti naturali e del loro forte impatto sulla salute umana e animale in quanto sono potenti inibitori della sintesi proteica (McLaughlin et al., 1977). Costituiscono una famiglia di più di sessanta metaboliti sesquiterpenoidi prodotti da diversi generi di funghi come metaboliti secondari, il cui scheletro è costituito dal farnesilpirofosfato (FPP). Fino a oggi sono stati descritti più di 200 tricoteceni (Grovey, 2007), che possono essere suddivisi in 4 gruppi in base alla loro struttura chimica. I tricoteceni di tipo A hanno una catena laterale di idrogeno o estere presso l'atomo di carbonio 8 (C-8) e fra le micotossine più importanti annoverano tossina T-2 (T-2), tossina HT-2 (HT-2), 4,15-diacetossiscirpenolo (DAS) e neosolaniolo (NEOS); i tricoteceni di tipo B hanno un chetone in C-8 e fra le micotossine più importanti di questo gruppo ci sono deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV), e i loro derivati acetilati.

PRODOTTO	LIVELLI MASSIMI (µG/KG)		
	DON	ZEА	T-2 + HT-2
Cereali non processati diversi da frumento duro, avena e mais	1250	100	
Frumento duro e avena	1750	100	100*
Mais non processato	1750	350	
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca, germe	750	75	
Pasta (secca)	750	-	
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500	50	
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto	-	100	
Cereali da colazione e merende a base di granoturco	-	100	
Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200	20	
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron, non destinati al consumo umano diretto	750	200	
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni ≤ 500 micron, non destinati al consumo umano diretto	1250	300	
* = valori ancora in discussione a livello di Commissione Europea			

Tab. 1 Valori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nei cereali e nei prodotti a base di cereali secondo Regolamento CE N. 1126/2007 del 28 settembre 2007

Entrambi i tipi A e B di tricoteceni sono prodotti da specie del genere *Fusarium*. I tricoteceni di tipo C (ulteriore epossido in 7 e 8) e quelli di tipo D (anello macrociclico strutturalmente diverso tra C-4 e C-15) non sono prodotti da *Fusarium* (Ueno, 1984).

I tricoteceni di tipo A e B mostrano entrambi tossicità acuta nei confronti di uomini e animali, provocando vomito e rifiuto del cibo, mentre i tricoteceni di tipo B sono implicati maggiormente rispetto agli altri anche in tossicosi croniche, con rischi di determinare col tempo emorragie estese e compromissioni del sistema immunitario (Desjardins, 2006). Inoltre, questi composti, potrebbero essere anche fattori di virulenza durante i processi infettivi della pianta di frumento da parte dei funghi produttori (Desjardins, 2006).

Tra i tricoteceni di tipo A, la T-2 è una delle micotossine più tossiche. È prodotta principalmente da *F. sporotrichoides* e *F. langsethiae*, due agenti patogeni del frumento che si sviluppano comunemente in ambienti caratterizzati da clima freddo. La malattia associata al consumo di cereali altamente contaminati da T-2 include nausea, vomito, lesioni necrotiche a carico di bocca e gola (il che rende difficile l'alimentazione), grave diarrea emorragica ed emorragie in molti organi del corpo. La T-2 è anche un potente immuno-

soppressore, perché provoca danni irreversibili al midollo osseo, portando a una riduzione dei globuli bianchi (leucopenia).

Tra i tricoteceni di tipo B, il DON è molto più comune della tossina T-2 nei cereali, e quindi nei frumenti. È prodotto principalmente da *F. graminearum* e *F. culmorum*, due fra i più importanti agenti causali della fusariosi nel frumento. DON è anche conosciuto come vomitotossina a causa delle sue potenti proprietà emetiche e della sua azione come fattore di rifiuto del cibo. Anche se molto meno tossica della T-2, il DON può avere un effetto biologico anche a concentrazioni molto basse. Ci sono stati casi in Asia di malattie negli esseri umani, come vomito, nausea, vertigini e mal di testa, associate al consumo di cereali contaminati da DON e probabilmente da concentrazioni molto più basse di altri tricoteceni.

La fitotossicità acuta dei tricoteceni e la loro presenza nei tessuti vegetali suggeriscono, inoltre, che tali micotossine svolgano un ruolo nella patogenesi delle specie di *Fusarium* che li producono. Diversi gruppi di lavoro hanno studiato il ruolo dei tricoteceni in una serie di malattie delle piante creando mutanti non produttori di tricoteceni. Per esempio, la biosintesi del DON è stata bloccata producendo la rottura del gene *Tri5* in *F. graminearum*. La virulenza di due mutanti non produttori di tricoteceni è risultata significativamente ridotta nei test in camera di crescita su piantine di frumento rispetto ai loro parentali produttori nella capacità di determinare l'insorgenza dei sintomi FSF. Questa prova conferma che i tricoteceni sono probabili fattori di virulenza nella fusariosi del frumento (Desjardins e Plattner, 2003).

Via biosintetica dei tricoteceni. Lo scheletro dei tricoteceni è costituito dal FPP, che è sintetizzato a partire da isopentenilpirofosfato (IPP) e dal suo isomero dimetilallilpirofosfato. La ciclizzazione di FPP fornisce il primo intermedio della catena biosintetica, il tricodiene (TDN). Il TDN subisce poi successivi gradi di ossigenazione, portando alla sintesi di isotricotolo e di altri isomeri tetra ossigenati del TDN. Dopo un secondo grado di ciclizzazione, si forma isotricodermolo, da cui viene sintetizzata calonectrina (CAL). Infine, a partire da CAL si può osservare la sintesi di DON e derivati acetilati (3A-DON e 15A-DON) o di NIV (Kimura et al., 2007).

Almeno metà dei geni richiesti per la sintesi dei tricoteceni sono riuniti nel “*Tri cluster*”, di circa 25 kb (fig. 1), comprendente sequenze geniche, quali i geni *Tri4* e *Tri5*, essenziali per la biosintesi della struttura base dei tricoteceni. Geni fiancheggiati, quali *Tri3* e *Tri13*, sono invece responsabili delle differenze strutturali dei diversi profili micotossigeni. Un'altra peculiarità del “*Tri cluster*” è che la ricombinazione tra geni posti alle estremità del cluster è fortemente repressa, mentre avviene tra i geni centrali, codificanti per enzimi base

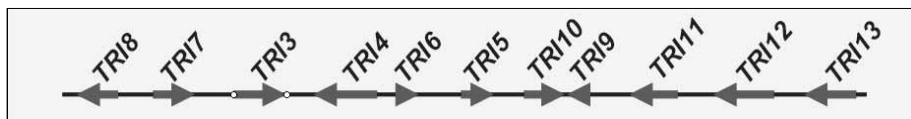


Fig. 1 *Cluster genico principale dei tricoteceni*

del pattern biosintetico. *Tri5* codifica infatti per la tricodiene sintasi, enzima responsabile del primo “step” di ciclizzazione (Hohn e Beremand, 1989). *Tri4* codifica invece per una citocromo P450 monoossigenasi (Hohn et al., 1995). I geni posti alle estremità del cluster sono invece correlati al chemiotipo, quali *Tri3*, che codifica per la 15-O-acetyltransferasi (McCormick et al., 1996) e che determina verosimilmente il chemiotipo 15ADON, o *Tri13*, codificante per una ossigenasi che porta al chemiotipo NIV (Lee et al., 2002). In tutti i chemiotipi, il gene *Tri5* è fiancheggiato da geni a funzione regolativa, quali *Tri6* e *Tri10*. *Tri6* è una *Cys2-His2 zinc-finger protein* coinvolta nella attivazione trascrizionale dei geni biosintetici sia presenti entro il cluster che al di fuori (Proctor et al., 1999; Tag et al., 2001). In particolare, *Tri6* si lega alla sequenza TNAGGCCT presente nel promotore di almeno dieci geni della catena di biosintesi (McCormick et al., 2004). *Tri 10* sembra inoltre agire a valle di *Tri6* (Tag et al., 2001) nel regolare positivamente i livelli biosintetici dei tricoteceni, ma anche degli isoprenoidi. Altri geni ancora, quali *Tri1* (codificante per citocromo P450) e *Tri101* (codificante una tricotecene 3-O-acetyltransferasi) sono stati identificati in posizioni lontane rispetto al cluster (Kimura et al., 2007).

SPECIE PRODUTTRICI DI TRICOTECENI DI TIPO B

Tra le specie che producono i tricoteceni di tipo B, diversi studi, effettuati soprattutto su *F. graminearum* e *F. culmorum*, hanno dimostrato che molti ceppi di queste due specie possono produrre un diverso spettro di tricoteceni B, in particolare DON e NIV e i loro derivati acetilati, 3-acetil-DON (3A-DON) e 15-acetil-DON (15A-DON), dando a una potenziale ampia varietà di chemiotipi. Sono stati descritti tre chemiotipi principali: chemiotipo NIV caratteristico di ceppi che producono NIV e 4-acetil-NIV (4A-NIV); chemiotipo 3A-DON con produttori di DON e 3A-DON; e chemiotipo 15A-DON con ceppi che producono DON e 15A-DON. Inoltre, alcuni ceppi sono stati riportati come produttori sia di DON sia di NIV, e sono stati descritti come chemiotipi sconosciuti (Ward et al., 2002). La presenza

SEQUENZA 5'-3'	DIMENSIONE DELL'AMPLICONE (bp)		RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
	CHEMIOTIPO NIV	CHEMIOTIPO DON	
Primer Forward TCGGTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse TGTGGAAGCGCGAGA	436	458-535	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TGCGTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse TGCCTAATATTGTGCTAATATTGTC		381-445	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TCGGTGGCAATATCTTCTTCTA Primer Reverse GGTTCAGTAACGTTTCGACAATAG	465		Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CGCCAATGCCGAGC Primer Reverse TGTGGAAGCGCGAGA	327	349-426	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward GGGCGAGGTGGYACTCTCAA Primer Reverse CCGCTCTTCTCTCTCCATCTC	3670	1273	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward TGGATGAATGACTTGAGTTGACA Primer Reverse AAAGCCTTCATTCACAGCC		483	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CATCATGAGACTGTGCRAGTTTGGG Primer Reverse GCTAGATCGAATTGTTGCATTGAG		282	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CCAATCCGAAACCGCAG Primer Reverse TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	312		Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CATCATGAGACTGTGCRAGTTTGGG Primer Reverse TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	1075	799	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward CAACCTGCTGCTGGCTGAG Primer Reverse CATAAAGGCCGTTGTTGAGAC	4051	3775	Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A., Nicholson P. (2003), «Phys Mol Plant Pathol», 62, pp. 355-367
Primer Forward ACTTTCGCCACCGAGTATTT Primer Reverse CAAAACCTGTTGTTCCACTGCC		525	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Logneco A., Mulè G., Visconti A. (2006), «FEMS Microbiol Lett», 259, pp. 7-13
Primer Forward CATCATACTCGCTCTGCTG Primer Reverse TT(AG)TAGTTTGCATCAATT(AG)TAG		708	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward GCAITGGCTAACACAATGA Primer Reverse TT(AG)TAGTTTGCATCAATT(AG)TAG		354	Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward ATCGTGACAGGTTTACG Primer Reverse TTCAAGTAAACGTTTCGACAAI	625		Quarra A., Mira G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. (2005), «Food Add Contam.», 22, pp. 309-315
Primer Forward GCCGTGGGGRTAAAGTCAAA Primer Reverse TGACAAGTCGGTGCACATAGCA	360	300	Li H.P., Wu A.B., Zhao C.S., Scholten O., Löffler H., Liao Y.C. (2005), «FEMS Microbiol Lett», 243, pp. 505-511
Primer Forward GGCCTTACGACTCCCTCAACATGG Primer Reverse AGAGCCCTGCGAAAG(C/T)ACTGGTGC	160	173-327	Lee T., Oh D.W., Kim H.S., Lee J., Kim Y.H., Yun S.H., Lee Y.W. (2001), «Appl Env Microbiol», 67 (7), pp. 2966-2972
Primer Forward CTTGTTAAGCTAAGCGTTTTT Primer Reverse AACCCCTTTCCTATGTGTTA		200	Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y. (2002), «Appl Env Microbiol», 68 (1), pp. 5472-5479

Tab. 2. Si riportano i riferimenti bibliografici e informazioni metodologiche (sequenza dei primer e dimensioni attese degli ampliconi) relativamente a sistemi analitici PCR per la caratterizzazione del chemiotipo in *Fusaria micotossigeni*

di questi chemiotipi all'interno di una stessa specie è legata ai polimorfismi riscontrati nel "Tri cluster" e potrebbe essere legata alla pressione selettiva dei diversi ambienti colonizzati dalle specie produttrici di tricoteceni B (Ward et al., 2002). Distinguere tra diversi chemiotipi è importante, perché le differenze nello schema di idrossilazione e acetilazione dei tricoteceni possono comportare notevoli differenze nella tossicità e nell'attività biologica (Kimura et al., 1998). Infatti, è stato dimostrato come il chemiotipo 3A-DON sia più tossico rispetto al chemiotipo 15A-DON in esperimenti su cavia e in genere produca più alte quantità di micotossine (Ward et al., 2008). D'altro canto, i lavori di Carter et al. (2002) e di Cumagun et al. (2004) indicano che i ceppi di *Fusarium* produttori di DON sono più aggressivi rispetto a quelli produttori di NIV su frumento, mentre la situazione si inverte su mais, suggerendo perciò come il chemiotipo sia legato all'aggressività e alla "fitness" del ceppo in relazione all'ospite.

L'avanzamento degli studi genetici e molecolari aventi come oggetto il pathway biosintetico dei tricoteceni in *Fusarium* e la conseguente conoscenza delle sequenze geniche coinvolte nella loro sintesi (Kimura et al., 2007) hanno permesso di sviluppare sistemi di tracciabilità molecolare per la caratterizzazione chemiotipica dei ceppi di *Fusarium*. In tabella 2 si riportano alcuni dei lavori più significativi riguardanti l'identificazione del chemiotipo all'interno delle specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni B.

Infine, la rivalutazione tassonomica di *F. graminearum* eseguita negli ultimi dieci anni, aumenta l'importanza di chiarire le relazioni tra i chemiotipi e nuove specie descritte all'interno della specie complessa *F. graminearum*, a livello sia chimico sia molecolare.

IL COMPLESSO DI SPECIE DI *F. GRAMINEARUM* (FGC)

La recente riclassificazione di *F. graminearum*, anche se controversa, necessita di un approccio alla tassonomia e all'identificazione di questa specie più attento rispetto al passato, dal momento che molti studiosi considerano *F. graminearum* come un complesso di specie. Negli ultimi anni, studi basati su polimorfismi di sequenza di DNA di undici geni nucleari e tre regioni intergeniche sono stati condotti da O'Donnell e collaboratori (O'Donnell et al., 2000; 2004), conducendo alla descrizione di undici specie all'interno di *F. graminearum*, definita come un complesso di specie (FGC). In seguito a ulteriori analisi filogenetiche su dati di sequenze multigeniche del DNA di 13 geni, Starkey e collaboratori (Starkey et al., 2007) hanno descritto due nuove specie all'interno del FGC,

mentre, più recentemente, Yli-Mattila e collaboratori (2009) hanno descritto *F. ussurianum*, agente patogeno del frumento nell'estremo oriente della Russia, considerato componente del nuovo gruppo asiatico nel FGC. Tuttavia, non tutti i ricercatori che lavorano su *Fusarium* sono d'accordo con la divisione di *F. graminearum* in specie diverse. Alcuni autori ritengono che nel FGC vi sono sottospecie, piuttosto che specie (Leslie e Summerell, 2006). Questa opinione è supportata dalla constatazione che, in generale, isolati di specie filogenetiche inter-fertili tendono ad avere un similarità di bande AFLP dell'ordine del 40-65%, e che *F. asiaticum* e *F. graminearum sensu stricto*, due membri del FGC, hanno similarità di bande AFLP pari a circa il 50%. Inoltre, solo tre delle specie ipotizzate mostrano caratteristiche morfologiche dei conidi utili nella loro differenziazione, e non c'è correlazione tra i lignaggi e gli specifici profili micotosigenici (Leslie et al., 2001; O'Donnell et al., 2000; 2004). Infine, in seguito al sequenziamento parziale del gene *Tri101* di 400 ceppi del FGC, Leslie e collaboratori (Leslie et al., 2007) hanno generato dati filogenetici che hanno portato gli autori a definire chiaramente che "vi è solo una singola specie in *F. graminearum*/*G. zeae*". Sono, dunque necessari ulteriori studi per determinare se all'interno di *F. graminearum* bisogna considerare l'esistenza di specie distinte filogenetiche o soltanto lignaggi subspecifici.

CHEMIOTIPI E FILOGENESI DI *F. GRAMINEARUM* IN ITALIA

Un gruppo di 64 ceppi appartenenti al FGC isolati da cereali in Italia, è stato analizzato per individuare il loro chemiotipo chimico e molecolare (Desjardins, 2008) e le loro caratteristiche filogenetiche. I ceppi sono stati ottenuti dalla collezione fungina dell'ISPA-CNR, Bari (www.ispa.cnr.it/Collection). Le analisi filogenetiche sono state basate su analisi di sequenza dei seguenti geni: fattore di allungamento della traduzione, β -tubulina, e istone 3. I frammenti amplificati, compresi tra le coppie di primer EF 1/2 (O'Donnell et al., 2000), T 1/22 (O'Donnell e Cigelnik, 1997) e H3-1a/1b (Glass e Donaldson, 1995), di 600, 1200 e 600 bp, rispettivamente, sono stati marcati a fluorescenza e sequenziati. Le sequenze derivate sono state allineate e confrontate a quelle depositate nei database di sequenza, corrispondenti ai ceppi utilizzati per definire i lignaggi all'interno di FGC (O'Donnell et al., 2000; 2004; Starkey et al., 2007; Ward et al., 2002).

I chemiotipi molecolari sono stati determinati attraverso PCR multiplex per determinare la capacità dei ceppi di produrre tricoteceni tipo-DON o tipo-NIV e 3A-DON o 15A-DON. Una prima analisi, effettuata con pri-

mer le cui sequenze erano basate su variazioni della sequenza nei geni *Tri5* e *Tri7*, è servita per distinguere i potenziali chemiotipi DON dai NIV, come descritto da Quarta e collaboratori (Quarta et al., 2005; 2006). Una seconda analisi, le cui sequenze dei primer erano basate su variazioni di sequenza nel gene *Tri3*, ha permesso di distinguere i ceppi potenziali produttori di 3A-DON dai 15A-DON (Quarta et al., 2006). Infine, il profilo micotossigenico per ogni ceppo è stato analizzato utilizzando il metodo della cromatografia liquida a elevato rendimento (HPLC).

Le indagini filogenetiche hanno mostrato l'appartenenza di tutti i ceppi analizzati a *F. graminearum sensu stricto*, eccetto due ceppi identificati come *F. cortadaeriae*. Il chemiotipo maggiormente presente è risultato 15A-DON. Sono stati rilevati anche chemiotipi DON e NIV, ma a bassi livelli, mentre un solo ceppo si è dimostrato produttore di 3A-DON. Questi dati dimostrano che la struttura genetica della popolazione italiana di FGC analizzata è omogenea sebbene possa presentare al proprio interno una piccola variabilità di chemiotipica. Inoltre, i dati ottenuti possono fornire indicazioni preziose ai fini di una gestione più efficace della malattia, e per mettere a punto un programma di miglioramento genetico che sviluppi strategie di difesa adeguate. Infine, la conoscenza della struttura genetica e chemiotipica di una popolazione di FGC permette anche una migliore comprensione dell'ecologia, dell'epidemiologia e della dinamica delle popolazioni presenti all'interno del FGC in un dato territorio.

SPECIE PRODUTTRICI DI TRICOTECENI DI TIPO A

Tra le specie di *Fusarium* citate in letteratura in grado di produrre tricoteceni di tipo A, diversi studi individuano principalmente in *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* le specie principalmente coinvolte nell'accumulo di tali micotossine nel frumento. In particolare, tali specie vengono considerate come le principali produttrici di T-2 e HT-2 (le micotossine più tossiche fra i tricoteceni) contaminanti naturalmente il frumento, soprattutto nel Nord Europa (Edwards, 2009). A queste specie viene aggiunta spesso anche *F. poae*, sulla quale, tuttavia, esistono molti dati contraddittori in quanto, sebbene tale specie venga considerata produttrice di alcuni dei tricoteceni di tipo A più noti quali DAS e NEOS, molti report, invece, indicano che *F. poae* non sia in grado di produrre T-2 e HT-2 (Somma et al., 2010). Stabilire con esattezza il profilo micotossigenico che attiene a ciascuna di queste specie è importantissimo per due ragioni principali: la prima è che una corretta valutazione di tale poten-

zialità fornirebbe utilissime indicazioni sul rischio micotossicologico reale che si corre in seguito alla diffusione di una data specie sul frumento; la seconda risiede nel fatto che, come precedentemente sottolineato, la contaminazione di T-2 e HT-2 nelle cariossidi di frumento e nei prodotti derivati sta per essere regolata a livello Europeo e quindi è necessaria una grande attenzione nella corretta identificazione delle specie produttrici di queste due micotossine.

A rendere più complessa l'esigenza di chiarire con estrema precisione il profilo micotossigeno di queste specie, è la confusione tassonomica che riguardava *F. poae* fino a pochissimi anni orsono, in quanto tale specie comprendeva anche *F. langsethiae*, descritta formalmente dal punto di vista morfologico solo recentemente da Torp e Nirenberg (2004), e precedentemente definita come *F. poae* "polveroso" (Torp e Langseth, 1999). Approfonditi studi di filogenesi hanno confermato la distinzione di *F. langsethiae* rispetto a *F. poae* (Yli-Mattila et al., 2004), mentre studi sulla produzione di micotossine da parte di popolazioni appartenenti alle due specie hanno dimostrato una profonda differenza nel profilo micotossigeno delle due specie con *F. langsethiae* considerata l'unica in grado di produrre T-2 e HT-2 (Thrane et al., 2004).

Infine, bisogna considerare che entrambe queste specie, *F. langsethiae* e *F. poae*, sono morfologicamente molto vicine a *F. sporotrichioides*, altra specie nota come produttrice di T-2 e HT-2 e la cui diffusione su frumento, sebbene confinata in ambienti dell'Europa Settentrionale, caratterizzati da un clima estremamente rigido (Yli-Mattila et al., 2008), viene segnalata sporadicamente anche in ambienti caratterizzati da un clima secco e caldo come l'Italia Meridionale (Logrieco e Moretti et al., 2008). In aggiunta, anche *F. poae* e *F. langsethiae*, vengono frequentemente segnalati oltre che nel Nord Europa, in ambienti Meridionali (Logrieco e Moretti, 2008). Se questa capacità di adattamento ad ambienti così diversi significhi che all'interno di queste specie si stiano sviluppando popolazioni in grado di variare geneticamente per poter colonizzare nuovi areali di diffusione, rappresenta una sfida interessante per future ricerche.

SPECIE DI *FUSARIUM* PRODUTTRICI DI ENNIATINE COINVOLTE NELLA FSF

Nell'ultima decade, in Europa sono stati segnalati in misura crescente, come contaminanti del frumento, i ciclodepsipeptidi, in particolare, enniatine e beauvericina (Logrieco et al., 2008), metaboliti tossici prodotti da alcune specie di *Fusarium* comunemente diffuse nel complesso di specie coinvolte nella FSF quali *F. avenaceum*, *F. poae* e *F. tricinctum* (Desjardins, 2006). Le

enniatine sono sostanze note come fitotossine da lungo tempo, in quanto in grado di determinare necrosi in diversi tipi di pianta (Gäumann et al., 1960). D'altro canto, anche la beauvericina ha dimostrato recentemente proprietà fitotossiche molto elevate nei confronti di protoplasti di pomodoro e di piantine della stessa coltura (Paciolla et al., 2004; 2008). Tuttavia, la preoccupazione derivante da enniatine e beauvericina è dovuta alla loro capacità di determinare effetti tossici su molti sistemi biologici animali (Logrieco et al., 2002). Infatti, a seguito della loro struttura ionoforica, tali metaboliti possono causare l'alterazione del trasporto ionico attraverso la membrana cellulare, attività che potrebbe condurre alla distruzione della selettività cationica della parete cellulare e, infine, indurre frammentazione del DNA e morte cellulare via apoptosi (Logrieco et al., 2004). Tale meccanismo di azione sembra essere alla base di un ampio spettro di attività cito-tossica nei confronti di linee cellulari di origine umana e animale (Calò et al., 2004; Lee et al., 2008) e induce a pensare che la contaminazione delle cariossidi di frumento da parte di enniatine e beauvericina, riportata da numerosi ricercatori (Logrieco et al., 2008), può rappresentare un'ulteriore fonte di preoccupazione per il consumo di frumento contaminato in campo da *Fusarium* coinvolti nella FSF.

LA PREVENZIONE ATTRAVERSO IL MONITORAGGIO A LIVELLO NAZIONALE E REGIONALE

Un approccio possibile per il controllo del problema legato alla contaminazione da micotossine nel frumento è un monitoraggio costante. A questo proposito, a livello europeo, recenti indagini di monitoraggio del territorio per la diffusione di specie di *Fusarium* hanno coinvolto i Paesi Bassi (Waalwijk et al., 2004) e diversi Paesi dell'Europa orientale, tra cui la Finlandia e la Russia (Yli-Mattila et al., 2004). Anche in Italia sono a oggi attivi progetti di monitoraggio dell'incidenza di *Fusaria* su scala regionale (Delogu et al., 2005; Rossi et al., 2006) e nazionale. A questo proposito, il progetto regionale "Fusariosi e micotossine", attraverso una duplice azione di monitoraggio del territorio regionale per presenza di micotossine in cereali a paglia e di prove "on farm", ha permesso di elaborare un prototipo di modello previsionale (FHB-DSS), in grado di definire il rischio della presenza di micotossine nelle principali specie cerealicole presenti nella regione Emilia-Romagna sulla base delle condizioni meteorologiche, delle caratteristiche della zona di coltivazione, della suscettibilità varietale e delle tecniche agronomiche utilizzate (Delogu et al., 2005). Analogamente, il sistema Qualimetre (<http://www.syngenta>).

com/en/corporate_responsibility/integrated_croppest_management.html), sviluppato da Syngenta sulla base dei dati raccolti da oltre 18.000 parcelle sperimentali di cereali a paglia, consente di fare previsioni sui livelli di micotossine in zone a vocazione cerealicola di Francia e Belgio, mentre il modello DONcast ha trovato applicazione in Canada (Hooker et al, 2002).

Le azioni di monitoraggio promosse dai diversi progetti regionali, nazionali ed europei sono state supportate dal parallelo sviluppo di metodiche analitiche efficienti. Metodiche classiche per la quantificazione dell'incidenza di FSF includono innanzitutto la valutazione visiva dei sintomi sulle spighe e sulla granella a raccolta (Hilton et al., 1999; Lacey et al., 1999). Questi approcci forniscono una stima dei sintomi della malattia fungina e quantificano quindi in modo indiretto la popolazione fungina presente. Al contrario, metodiche basate sulla conta delle cariossidi infette (Henriksen e Elen, 2005) forniscono informazioni quantitative sulla popolazione fungina esistente, ma richiedono tempi lunghi di analisi e un alto grado di expertise per la classificazione tassonomica dei funghi. I metodi analitici "diretti", basati sull'uso di GC-MS, HPLC, TLC, NIR e saggi immunologici ELISA, determinano invece direttamente la quantità di micotossina presente. Le diverse metodiche presentano vantaggi e svantaggi peculiari, quali ad esempio l'alto costo e l'alta affidabilità delle tecnologie basate su HPLC e GC-MS, la semplicità d'analisi e il basso costo dell'approccio ELISA, la rapidità affiancata però da bassa affidabilità della metodica NIR.

LA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE

Fondamentale per lo sviluppo di metodiche di tracciabilità molecolari efficienti, è stato l'avanzamento degli studi genetici e molecolari aventi come oggetto il pathway biosintetico dei tricoteceni in *Fusarium* (Kimura et al., 2007). Infatti, partendo da alcune sequenze geniche coinvolte nella loro sintesi, si sono potuti sviluppare sistemi di tracciabilità molecolare delle specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni. A questo riguardo, diversi sistemi analitici basati su PCR *end point* e *real time* sono stati pubblicati. In tabella 3 sono riportati lavori focalizzati sull'identificazione di *Fusarium* micotossigenici applicabili a campioni di granella.

In particolare, l'approccio analitico qPCR sviluppato da Terzi et al. (2007) si è dimostrato applicabile a una varietà di campioni provenienti da diverse filiere. Il sistema è stato infatti validato su diversi cereali, provenienti da ambienti geografici diversi e caratterizzati da alta variabilità nel tenore di

SPECIE FUN- GINA	SEQUENZA 5'-3'	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward TCACCCAGACGGGAATGA Primer Reverse GAACGCTGCCCTCAAGCTT probe CACTTGGATATTTCC	Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costel-de Corainville G., Hausen-Hahn I., Kastelein P., Kohl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J. (2004), «Eur J Plant Pathol», 110, pp. 481-494
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward ATGGTGAACCTCGTGTGCG Primer Reverse CCCTTCTTACGCCAATCTTCG	Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D. (1998), «Physiol Mol Plant Pathol», 53, pp. 17-37
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward GATGCCAGACCAAGACGAAG Primer Reverse GATGCCAGACGCACTAAGAT	Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D. (2005), «Int J Food Microbiol», 103, pp. 271-284
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward TTCACTAGATCGTCCGGCAG Primer Reverse GAGCCCTCCAAGCGAGAAG probe AAAGAAGTTGCAATGTTAGTG	Schilling A.G., Moller E.M., Geiger H.H. (1996), «Phytopathol», 86, pp. 515-522 Brandfass C., Karlovsky (2006), «BMC Microbiology», 6, p. 4 doi:10.1186/1471-2180/6/4
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward GTACCAGAGCAC GGC GTTG Primer Reverse TCGCTCTCGATCAAAAGAAAG probe ACAAGTCCCTCGACGTG	Leisova L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward GGCGCTTCTCGTGAACACA Primer ReverseGGCTAAACAGCACGAATGC probe AGATATGTCICTTCAAGTCT	Leisova L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward CTCGGGATATGTTGCGTCAA Primer Reverse GGTAGGTATCCGACATGGCAA	Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costel-de Corainville G., Hausen-Hahn I., Kastelein P., Kohl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J. (2004), «Eur J Plant Pathol», 110, pp. 481-494
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward GGTCCTCGACAGCAATGGTGTT Primer Reverse GCITGTGTTTTCGTGGCAGT probe ACAAGGGCACCTCTGAGCTCCAGC	Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W., Joyce D. (1998), «Physiol Mol Plant Pathol», 53, pp. 17-37
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward AGGGACATAAGTGCAGA Primer Reverse ACTGTGCACTGTCGCAAGTG	Brandfass C., Karlovsky (2006), «BMC Microbiology», 6, p. 4 doi:10.1186/1471-2180/6/4
<i>Eculmorum</i>	Primer Forward CAAAAGCTTCCGAGTGTGTC Primer Reverse GGCGAAGGTTCAAGGATGAC	Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K., Gaba D. (2005), «Int J Food Microbiol», 103, pp. 271-284
<i>Fgraminearum</i>	Primer Forward AATATGGAAAACGGAGTTCACTACA Primer Reverse ATTGCGGTGCTCTCAAAAGT	Reischer G.H., Lemmens M., Farnleitner A., Adler A., Mach R.L. (2004), 59 (1), pp. 141-146
<i>Fusarium spp.</i>	Primer Forward GCTGCTCATCATTTTGCTCAG Primer Reverse CTGATCTGGTCACGCTCATC	Niessen L., Vogel R.F. (1997), «Syst Appl Microbiol», 20, pp. 111-123
<i>Fusarium spp.</i>	Primer Forward TGAATTACATGGAGGCCGAATCTCA Primer Reverse TTCGAATGTTGTTGATTCATAGTCGTT probe TTGCCCCCTTTTGATCGAGTTGCGTCTCCC	Niessen L., Kucera L., Chrpova J., Sykorova S., Sip V., Ovesna J. (2006), «J Phytopathol», 154, pp. 603-611 Terzi V., Morcia C., Faccioli P., Faccini N., Rossi V., Cigolini M., Corbellini M., Scudellari D., Delogu G. (2007), «Int. J Food Sci Technol», 42, pp. 1390-1396 Niessen L., Vogel R.F. (1997), «Syst Appl Microbiol», 21, pp. 618-631 Schnerr H., Niessen L., Vogel R.F. (2001), «Int Jf Food Microbio», 71, pp. 53-61 Bluhm B.H., Cousin M.A., Woloshuk (2004), «J Food Protect», 67 (3), pp. 536-543

Tab. 3. Diversi sistemi analitici basati su PCR e qPCR sono disponibili per l'identificazione e quantificazione di *Fusaria micotosigeni*. In tabella sono riportati i riferimenti bibliografici e le sequenze dei primer

contaminazione. Inoltre, l'approccio di qPCR sviluppato si è dimostrato un efficace strumento per rilevare precocemente la presenza di funghi micotossigeni prima della comparsa di sintomi visibili sulla pianta. L'utilità del sistema è perciò da riferire da una parte al potenziamento dei test analitici ufficiali; dall'altra alla possibilità di operare una diagnosi estremamente precoce, in campo, a stadi fenologici in cui le classiche procedure di rilievo dei sintomi sono inefficaci (Rossi et al., 2007).

Il sistema analitico sviluppato è stato applicato anche a campioni provenienti dalla filiera di produzione di cereali maltati, allo scopo di verificare l'applicabilità del sistema d'analisi e per seguire l'eventuale abbattimento/incremento di DNA fungino e DON durante il processo della maltazione. A questo scopo sono stati selezionati campioni di granella di frumento tenero e frumento duro provenienti dalla rete di monitoraggio 2006 del progetto inter-regionale MICOCER. I campioni presi in considerazione avevano un tenore in micotossine al di sotto dei limiti di legge, ma comunque rilevabile. È stato quantificato il DNA fungino sia sui campioni di granella tal quale, sia dopo maltazione. I risultati, espressi come valori di cicli soglia o Ct, sono riportati nella figura 2. In tutti i campioni si evidenzia un incremento del valore di Ct dopo maltazione, indicativo di un abbattimento nel livello di DNA fungino. Poiché preliminarmente alla maltazione si esegue routinariamente una setacciatura, una possibile spiegazione dell'abbattimento della contaminazione può essere legata all'allontanamento dei semi striminziati, particolarmente attaccati dal fungo. Altri trattamenti fisici, legati allo molitura, sono di potenziale interesse per la riduzione del livello di contaminazione. In particolare la decorticazione e la perlatura si sono rivelate efficaci nella riduzione del tenore di DON in granella di frumento duro (Rios et al., 2009).

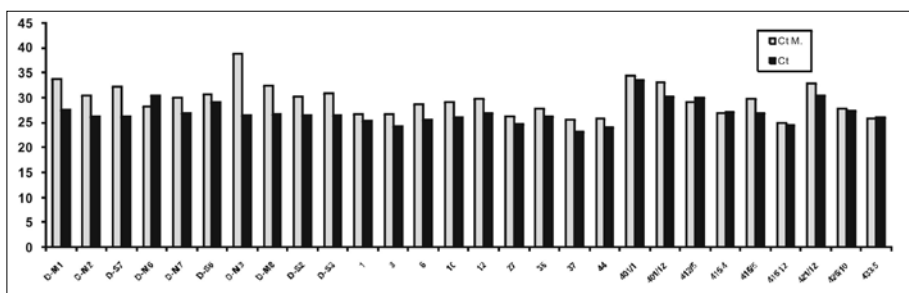


Fig. 2 valori di Ct dei campioni di frumento prima (barre scure) e dopo maltazione (barre chiare)

RIASSUNTO

La fusariosi della spiga di frumento (FSF) è oggetto di crescente attenzione in tutto il mondo per l'impatto che la malattia può avere sulla riduzione del raccolto, sulla qualità delle cariossidi e sulla salute umana per la contaminazione da micotossine. Inoltre destano preoccupazione anche la diffusione di specie di *Fusarium* patogene e micotossine emergenti, e la grande variabilità inter- e intra-specifica che caratterizza numerose specie di *Fusarium* che fanno parte del complesso di specie che causano la FSF. La principale classe di micotossine prodotte dalle specie coinvolte è quella dei tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica, che possono determinare, fra i vari effetti, anche forme molto serie di immuno-deficienza sia nell'uomo sia negli animali in allevamento. In base alla presenza o assenza di un gruppo chetonico in posizione C8, che conferisce una maggiore tossicità, i tricoteceni possono dividersi in tricoteceni A, fra i quali la tossina T-2 è sicuramente la micotossina dotata di maggiore tossicità, e i tricoteceni di tipo B, fra i quali la più nota è il deossinivalenolo, detto anche vomitossina, molto diffuso nelle cariossidi di frumento in tutto il mondo. L'Unione Europea ha stabilito dei livelli massimi di contaminazione delle derrate alimentari a base di frumento per diverse micotossine. È, dunque importantissimo, riuscire a contenere in campo le specie di *Fusarium* che le producono attraverso strategie di lotta appropriate. Tali strategie non possono non partire prima di tutto dalla corretta identificazione delle diverse specie di *Fusarium* coinvolte nella FSF, e quindi da una conoscenza profonda delle loro principali caratteristiche tossinogeniche, biologiche e genetiche. In questo lavoro, verrà fornita una illustrazione delle principali caratteristiche genetiche e tossinogeniche delle specie di *Fusarium* più importanti per la FSF e saranno illustrati i risultati di alcuni studi tesi a sviluppare strumenti molecolari per una diagnosi precoce delle specie di *Fusarium*, e ad analizzare la variabilità genetica intra-specifica di *F. graminearum*, la principale specie tossinogenica coinvolta nella FSF.

ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) of wheat has been increasing its importance worldwide due to the impact that the disease can have on the yield reduction, kernel quality and human health because of the mycotoxin contamination. Moreover, emerging *Fusarium* pathogens and related mycotoxins and the wide genetic variability of several species involved in FHB are sources of further concern. The main class of mycotoxins produced by *Fusarium* on wheat are the trichothecenes, potent inhibitors of protein synthesis, than can cause severe deficiency of the immune system in both humans and animals. According with the presence or absence of a chetonic group in C8 of the trichothecene skeleton, these mycotoxins can be divided in trichothecene A, among which T-2 toxin is surely the mycotoxin provided of the highest toxicity, and trichothecene B, among which the most known is deoxynivalenol, that often occurs in the wheat kernels worldwide. The European Union has fixed severe tolerance levels of occurrence in wheat and wheat-based food for several *Fusarium* mycotoxins. Therefore it is extremely important to control in the field the *Fusarium* species that produce mycotoxins by using reliable control strategies. However, these strategies must be funded both on a correct identification of the different *Fusarium* species involved in the FHB and a knowledge of their main toxinogenic,

biological and genetic traits. In this paper, an overview of main genetic and toxinogenic traits of *Fusarium* species for FHB, will be provided. Moreover, the main results of studies carried out for the development of early detection methods of *Fusarium* species in the field and for the analyses of intra-specific genetic variability of *F. graminearum*, the main species involved in FHB, will be described.

BIBLIOGRAFIA

- ABECASSIS J., FEILLET P. (2003): *Basis of knowledge on deoxynivalenol distribution in durum wheat, semolina and pasta products*, in D'Egidio M.G. (Ed.), *Proceedings of the Second International Workshop on Durum Wheat and Pasta Quality: Recent Achievements and New Trends*. MiPAF Cereals Experimental Institute, Rome, Italy, pp. 135-139.
- BECHTEL D.B., KALEIKAU L.A., GAINES R.L., SEITZ L.M. (1985): *The effects of Fusarium graminearum infection on wheat kernels*, «Cereal Chemistry», 62, pp. 191-197.
- CALÒ L., FORNELLI F., RAMIRES R., NENNA S., TURSI A., CAIAFFA M.F., MACCHIA L. (2004): *Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin*, «Pharmacological Research», 49, pp. 73-77.
- CARTER J.P., REZANOOR H.N., HOLDEN D., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., NICHOLSON P. (2002): *Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of Fusarium graminearum*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 573-583.
- CAST – COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (2003): *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*. Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA, 199 pp.
- CUMAGUN C.J.R., BOWDEN R., JURGENSON J., LESLIE J., MIEDANER T. (2004): *Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of Gibberella zeae (Fusarium graminearum) toward wheat*, «Phytopathology», 94, pp. 520-526.
- DELOGU G., TERZI V., ROSSI V., CIGOLINI M., SCUDELLARI D. (2005): *Micotossine nei cereali, pronto un nuovo metodo per ridurre i rischi*, «Agricoltura», Luglio-Agosto, pp. 121-123.
- DESJARDINS A.E. (2006): *Fusarium mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.
- DESJARDINS A.E. (2008): *Natural Product Chemistry Meets Genetics: When is a Genotype a Chemotype?*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 56, pp. 7587-7592.
- Desjardins A.E., Plattner R.D. (2003): *Diverse traits for pathogen fitness in Gibberella zeae*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 25, pp. 21-27.
- EDWARDS S., BARRIER-GUILLOT B., CLASEN P.E., HIETANIEMI V., PETERSSON H. (2009): *Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production*, «World Mycotoxin Journal», 2, pp. 173-179.
- GAUMANN E., NAEF-ROTH S.T., KERN H. (1960): *Zur phytotoxischen wirksamkeit der enniatine*, «Phytopathologische Zeitschrift», 40, pp. 45-51.
- GLASS N.L., DONALDSON G.C. (1995): *Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes*, «Applied and Environmental Microbiology», 61 (4), pp. 1323-1330.
- GOSWAMI R.S., KISTLER H.C. (2004): *Heading For Disaster: Fusarium graminearum on cereal crops*, «Molecular Plant Pathology», 5 (6), pp. 515-525.

- GROVEY J. F. (2007): *The trichothecenes and their biosynthesis*, «Fortschr. Chem. Org. Naturst.», 88, pp. 63-130.
- HENRIKSEN B., ELEN O. (2005): *Natural Fusarium grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides*, «Journal of Phytopathology», 153, pp. 214-220.
- HILTON A.J., JENKINSON P., HOLLINS T.W., PARRY D.W. (1999): *Relationship between cultivar height and severity of Fusarium ear blight in wheat*, «Plant Pathology», 48, pp. 202-208.
- HOHN T.M., BEREMAND P.D. (1989): *Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus Fusarium sporotrichioides*, «Gene», 79, pp. 131-138.
- HOHN T.M., DESJARDINS A.E., MCCORMICK S.P. (1995): *The Tri4 gene of Fusarium sporotrichioides encodes a cytochrome P450 mono-oxygenase involved in trichothecene biosynthesis*, «Molecular General Genetics», 248, pp. 95-102.
- HOOKE D.C., SCHAAF SMA A.W. (2003): *The DONcast model: using weather variables pre and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat*, «Aspects of Applied Biology», 68 (17), pp. 117-122.
- JENNINGS P., COATES M.E., WALSH K., TURNER J.A., NICHOLSON P. (2004): *Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of Fusarium graminearum isolated from wheat crops in England and Wales*, «Plant Pathology», 53, pp. 643-652.
- KIMURA M., TOKAI T., TAKAHASHI-ANDO N., OHSATO S., FUJIMURA M. (2007): *Molecular and genetic studies of Fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes and evolution*, «Bioscience, Biotechnology and Biochemistry», 71 (9), pp. 2105-2123.
- KIMURA M., KANEKO I., KOMIYAMA M., TAKATSUKI A., KOSHINO H., YONEYAMA K. AND YAMAGUCHI I. (1998): *Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101*, «Journal of Biological Chemistry», 273, pp. 1654-1661.
- LACEY J., BATEMAN G.L., MIROCHA C.J. (1999): *Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by Fusarium spp. in wheat*, «Annals of Applied Biology», 134, pp. 277-283.
- LEE T., HAN Y.-K., KIM K.-H., YUN S.-H., LEE Y.-W. (2002): *Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of Gibberella zeae*, «Applied and Environmental Microbiology», 68, pp. 2148-2154.
- LEE H.S., SONG H.H., JEONG J.H., SHIN C.G., CHOI S.U. AND C. LEE. (2008): *Cytotoxicity of enniatins H, I, and MK 1688 from Fusarium oxysporum KFCC 11363P*, «Toxicon», 51, pp. 1178-1185.
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory manual*, Blackwell Publishing: Iowa, USA, pp. 388.
- LESLIE J.F., ZELLER K.A., SUMMERELL B.A. (2001): *Icebergs and species in populations of Fusarium*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 59, pp. 107-117.
- LESLIE J.F., ANDERSON L., BOWDEN R.L., LEE Y. (2007): *Inter- and intraspecific genetic variation in Fusarium*, «International Journal of Food Microbiology», 119, pp. 25-32.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI, A., CAIFFA, M.F., MACCHIA, L. (2002): *Beauvericin: Chemistry, Biology and Significance*, in *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation* (R.K. Upadhyay, ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 23-30.
- LOGRIECO A., MORETTI A. (2008): *Between emerging and historical problems: an overview of the main toxigenic fungi and mycotoxin concerns in Europe*, in *Mycotoxins*.

- Edited by Leslie, J., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. CABI, Oxfordshire, UK, 139.
- McLAUGHLIN C.S., VAUGHN M.H., CAMPBELL J.M., WEI C.M., STANFORD M.E., HAN-SIN B.S. (1977): *Inhibition of protein synthesis by trichothecenes*, in: *Mycotoxins in human and animal health*, Edited by J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman. Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill., USA, pp. 262.
- MARASAS W.F.O., GELDERBLOM W.C.A., SHEPHARD G.S., WISMER H.F. (2008): *Mycotoxins: A global problem*, in *Mycotoxins*, Edited by Leslie, J., Bandyopadhyay, R., and Visconti, A. CABI, Oxfordshire, UK, pp. 139.
- McCORMICK, S.P., HARRIS, L.J., ALEXANDER, N.J., OUELLET, T., SAPARNO, A., ALLARD, S., DESJARDINS, A.E. (2004): *Tri1 in Fusarium graminearum encodes a P450 oxygenase*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, pp. 2044-2051.
- McCORMICK S.P., HOHN T.M., DESJARDINS A.E. (1996): *Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from Fusarium sporotrichioides*, «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 353-359.
- MILLER J.D. (1995): *Fungi and mycotoxins in grain: implication for stored product research*, «Journal of Stored Products Research», 31, pp. 1-16.
- O'DONNELL K., KISTLER H.C., TACKE B.K., CASPER H.H. (2000): *Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97, pp. 7905-7910.
- O'DONNELL K., WARD T.J., GEISER D.M., KISTLER H.C., AOKI T. (2004): *Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade*, «Fungal Genetics and Biology», 41, pp. 600-623.
- O'DONNELL K., CIGELNIK E. (1997): *Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous*, «Molecular Phylogenetics and Evolution», 7 (1), pp. 103-116.
- PACIOLLA C., DIPIERRO N., MULÈ G., LOGRIECO A., DIPIERRO S. (2004): *The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration in the ascorbate metabolism in tomato protoplasts*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 65, pp. 49-56.
- PACIOLLA C., IPPOLITO M.P., LOGRIECO A., DIPIERRO N., MULÈ G., DIPIERRO S. (2008): *A different trend of antioxidant responses makes tomato plants less susceptible to beauvericin than T—2 mycotoxin phytotoxicity*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 72, pp. 3-9.
- PANCALDI D., ALBERTI I. (2001): *Le principali malattie su foglia e spiga del frumento*, «L'Informatore Agrario», 20, pp. 63-69.
- PASQUINI M., DELOGU G. (2005): *Malattie dei cereali a paglia*, Ed Regione Lombardia, Garlasco (PV), Italy, PromoPavese Press.
- PROCTOR R.H., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., HOHN T.M. (1999): *A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in Gibberella fujikuroi mating population A*, «Fungal Genetics and Biology», 27, pp. 100-112.
- QUARTA A., MITA G., HAIDUKOWSKI M., SANTINO A., MULÈ G., VISCONTI A. (2005): *Assessment of trichothecene chemotypes of Fusarium culmorum occurring in Europe*, «Food Additives and Contaminants», 22, pp. 309-315.
- QUARTA A., MITA G., HAIDUKOWSKI M., LOGRIECO A., MULÈ G., VISCONTI A. (2006): *Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in Fusarium*, FEMS Microbiology Letters, 259, pp. 7-12.

- RIO G., PINSON. GADAIS L., ABECASSIS J., ZAKHIA-ROZIS N., LULLIEN-PELLERIN V. (2009): *Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and Fusarium level in durum wheat grains*, «Journal of Cereal Science», 49, pp. 387-392.
- ROSSI V., TERZI V., MOGGI F., MORCIA C., FACCIOLI P., HAIKOWSKI M., PASCALE M. (2007): *Assessment of Fusarium infection in wheat heads using a quantitative polymerase chain (QPCR) assay*, «Food Additives and Contaminants», 24 (10), pp. 1121-1130.
- ROSSI V., GIOSUÈ S., CIGOLINI M., DELOGU G., FACCINI N., TERZI V., SCUDELLARI D. (2006): *Un aiuto alla gestione della fusariosi della spiga*, «L'Informatore Agrario», 14, pp. 62-68.
- SOMMA S., ALVAREZ C., RICCI V., FERRACANE L., RITIENI A., LOGRIECO A., MORETTI A. (2010): *Trichothecene and beauvericin production and amplified fragment length polymorphism analysis of Fusarium poae isolated from wheat kernels in Northern-Italy*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- STACK R.W. (2003): *History of Fusarium head blight with emphasis on North America*, In *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (Leonard, K.J. and Bushnell, W.R., eds). St. Paul, MN: APS Press, pp. 1-34.
- STARKEY D.E., WARD T.J., AOKI T., GALE L.R., KISTLER H.C., GEISER D.M., SUGA H., TÓTH B. VARGA J., O'DONNELL, K. (2007): *Global molecular surveillance reveals novel Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity*, «Fungal Genetics and Biology», 44, pp. 1191, 2007.
- TAG A.G., GARIFULLINA G.F., PEPLOW A.W., AKE C. JR., PHILLIPS T.D., HOHN T.M., BEREMAND M.N. (2001): *A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression*, «Applied and Environmental Microbiology», 67, pp. 5294-5302.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLI P., FACCINI N., ROSSI V., CIGOLINI M., CORBELLINI M., SCUDELLARI D., DELOGU G. (2007): *Fusarium DNA traceability along the bread production chain, International*, «Journal of Food Science and Technology», 42 (12), pp. 1390-1396.
- TORP M., NIRENBERG H.I. (2004): *Fusarium langsethiae sp. nov. on cereals in Europe*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp 247-256.
- TORP M., LANGSETH W. (1999): *Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae*, «Mycopathologia», 147, pp. 89-96.
- THRANE U., ASLER A., CLASEN P., GALVANO F., LANGSETH W., LEW H., LOGRIECO A., NIELSEN K., RITIENI A. (2004): *Diversity in metabolite production by Fusarium langsethiae, Fusarium poae, and Fusarium sporotrichioides*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 257-266.
- UENO Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes*, *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, S124.
- WAALWIJK C., VAN DER HEIDE R., DE VRIES I., VAN DER LEE T., SCHOEN C., COSTRELE CORAINVILLE G., HAUSER-HAHN I., KASTELEIN P., KÖHL J. et al. (2004): *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan*, «European Journal of. Plant Pathology», 110, pp. 481-494.
- WARD T.J., BIELAWSKI J.P., CORBY KISTLER H., SULLIVAN E., O'DONNELL K. (2002): *Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium*, «Proceeding of the National Academy of Science», 99, pp. 9278-9283.
- WARD, T.J., CLEAR, R.M., ROONEY, A.P., O'DONNELL, K., GABA, D., PATRICK, S., STARKEY, D.E., GILBERT, J., GEISER D.M., NOWICKI, T.W. (2008): *An adaptive evolutionary*

- shift in Fusarium head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic Fusarium graminearum in North America*, «Fungal Genetics and Biology», 45, pp. 473-484.
- XU X.M., PARRY D.W., NICHOLSON P., THOMSETT M.A., SIMPSON D., EDWARDS S.G., COOKE B.M., DOOHAN F.M., BRENNAN J.M., MORETTI A., TOCCO G., MULE G., HORNOK L., GICZEY G., TATNELL J. (2005): *Predominance and association of pathogenic species causing Fusarium ear blight in wheat*, «European Journal of Plant Pathology», 112, pp. 143-154.
- YLI-MATTILA T., MACH R.L., ALEKHINA I.A., BULAT S.A., KOSKINEN S., KULLNIG-GRADINGER C.M., KUBICEK C.P., KLEMSDAL S.S. (2004): *Phylogenetic relationship of Fusarium langsethiae to Fusarium poae and F. sporotrichioides as inferred by IGS, ITS, -tubulin sequence analysis and UP-PCR*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 267-285.
- YLI-MATTILA T., PAAVANEN-HUHTALA S., JESTOI M., PARIKKA P., HIETANIEMI V., GAGKAEVA T., SARLIN T., HAIKARA A., LAAKSONEN S., RIZZO A. (2008): *Real-time PCR detection and quantification of Fusarium poae, F. graminearum, F. sporotrichioides and F. langsethiae in cereal grains in Finland and Russia*, «Archives of Phytopathology and Plant Protection», 41, pp. 243-260.
- YLI-MATTILA T., GAGKAEVA T., WARD T.J., AOKI T., KISTLER H.C., O'DONNELL K. (2009): *A novel Asian clade within the Fusarium graminearum species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East*, «Mycologia», 101, pp. 841-852.

MARIA LUISA CHIUSANO*, NUNZIO D'AGOSTINO*,
ALESSANDRA TRAINI*, MIRIAM DI FILIPPO*, LUIGI FRUSCIANTE*

ISOL@: una piattaforma bioinformatica per l'analisi strutturale e funzionale del genoma del pomodoro

INTRODUZIONE

La famiglia delle Solanaceae comprende circa 95 generi e almeno 2.400 specie molte delle quali hanno una notevole importanza economica, in quanto largamente coltivate come fonte di cibo (pomodoro, patata, melanzana, peperone), a scopo ornamentale (petunia), a scopo farmaceutico per il loro contenuto in alcaloidi (tabacco, belladonna, stramonio). Le specie appartenenti a questa famiglia mostrano un'ampia variabilità fenotipica e occupano differenti nicchie ecologiche nonostante presentino una elevata conservazione del genoma intesa sia come numero di base dei cromosomi (12) sia come livello di similarità lungo le sequenze genomiche.

La necessità di approfondire la conoscenza sulle caratteristiche molecolari che determinano la variabilità fenotipica e l'adattamento ecologico delle diverse specie di Solanaceae ha portato, nell'anno 2004, a far convergere gli sforzi dei singoli gruppi di ricerca in un progetto organico denominato "International Solanaceae (SOL) Genome Project" (Mueller et al., 2005a).

In questo ambito è stata lanciata l'iniziativa "International Tomato Genome Sequencing Project" (Mueller et al., 2005b), con il fine di sequenziare il genoma del pomodoro a partire dalla definizione della sequenza completa della regione eucromatica. L'obiettivo a lungo termine è quello di sfruttare le informazioni di sequenza generate, per l'analisi dell'organizzazione e della funzionalità del genoma, nonché per comprendere i meccanismi evolutivi alla base della diversificazione dell'intera famiglia delle Solanaceae.

* *Dip. Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II*

Al fine di affrontare le questioni chiave sollevate dalla visione del SOL, sono in corso di generazione grandi quantità di dati derivati da diversi approcci ‘-omici’. Questi dati vanno ad arricchire quelli resi disponibili per le Solanaceae nel corso degli anni.

Gli approcci di tipo bioinformatico sono gli unici che consentono l’analisi di quantità di dati cospicui ed eterogenei come quelli che la comunità scientifica delle Solanaceae produce allo scopo di identificare caratteristiche strutturali utili a comprendere i processi molecolari che determinano la variabilità fenotipica degli organismi e le loro complesse funzionalità.

La bioinformatica, pertanto, esercita un ruolo chiave nell’interpretazione dei dati grezzi e nella loro conversione in informazione biologicamente significativa. Inoltre consente una visione ‘olistica’ con un approccio determinante nel rilevare le proprietà emergenti dall’insieme che caratterizza il sistema biologico. La necessità di tale disciplina nella ricerca scientifica moderna è legata allo sviluppo di metodologie che consentono di analizzare, integrare e organizzare grandi quantità di dati al fine di renderli fruibili dalla comunità scientifica mediante risorse idonee. La differenziazione delle risorse, l’eterogeneità dei dati, la qualità delle loro annotazioni e, infine, il livello di dettaglio introdotto nelle specifiche analisi costituiscono il valore aggiunto per un approccio bioinformatico efficace che, di conseguenza, si complica ponendo sfide sempre più consistenti sia dal punto di vista biologico sia dal punto di vista informatico.

Al fine di contribuire in questo ambito, abbiamo progettato e organizzato ISOL@ (Chiusano et al. 2008), una risorsa italiana per la genomica delle Solanaceae. Essa è stata concepita per raccogliere, integrare e riconciliare i risultati generati dai diversi approcci ‘-omici’ all’interno del consorzio SOL al fine di creare una piattaforma utile per sostenere la ricerca su molti degli aspetti della genomica delle Solanaceae.

IL SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA DEL POMODORO

Il sequenziamento del genoma del pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706) è in corso e la sua prima bozza è stata recentemente completata (Mueller et al., 2009). Il genoma (950 Mb; Arummanganathan & Earle 1991) è organizzato in 12 cromosomi ed è costituito in larga parte da eterocromatina che è ricca in sequenze ripetute (Peterson et al., 1996). È stato stimato che la maggior parte dei geni (>90%) risiede nella porzione eucromatica del genoma, la quale corrisponde a circa un quarto (~250 Mb) dell’intera sequenza genomica (Van der Hoeven et al., 2002).

Analisi citogenetiche (De Jong et al., 1999, 2000) hanno mostrato che l'eucromatina si colloca generalmente nella parte distale dei cromosomi (fatta eccezione per i telomeri) e circonda la regione eterocromatica pericentromerica.

Poiché il DNA eterocromatico è ricco in sequenze ripetute (pertanto difficile da sequenziare ed assemblare) e povero in geni, il consorzio ha deciso, in prima istanza, di sequenziare soltanto la porzione eucromatica del genoma. L'attuazione del progetto coinvolge dieci paesi, tra i quali l'Italia, che si sta occupando di determinare la sequenza nucleotidica del cromosoma 12.

Per il sequenziamento è stata adottata la strategia BAC-by-BAC (Bacterial artificial chromosome), già impiegata con successo nel sequenziamento di altri genomi quali *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) e riso (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Questa strategia consiste nel sequenziare alcuni BAC (definti *seed*) che risultano ancorati alla mappa genetica ad alta densità F_2 -2000 (vedi Fulton et al., 2002). Tali BAC rappresentano dei punti di partenza per estendere la sequenza mediante BAC *walking* in modo da generare il '*Minimum Tiling Path*' cioè individuare la collezione di frammenti genomici in grado di coprire la regione cromosomica di interesse con il minor grado di sovrapposizione. Nell'ottobre 2008 erano disponibili nella banca dati GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 1095 sequenze BAC equivalenti a ~120 Mb.

Con l'emergere delle cosiddette "tecnologie di sequenziamento di nuova generazione" (Roche 454, Illumina Solexa, Applied Biosystems SOLiD) si sono rese disponibili valide alternative strategiche e tecnologiche da applicare al sequenziamento del genoma di pomodoro. Pertanto, nell'ottobre 2008 cinque membri del consorzio SOL, tra i quali l'Italia, hanno lanciato una iniziativa che ha orientato la comunità scientifica a considerare fattibile il sequenziamento dell'intero genoma mediante un approccio 'whole genome shotgun' (WGS). L'obiettivo è quello di combinare tale approccio con i risultati già disponibili, ottenuti applicando la strategia BAC-by-BAC, per portare a conclusione il sequenziamento dell'intero genoma di pomodoro entro il 2010.

L'ANNOTAZIONE DEL GENOMA DEL POMODORO

Nell'ambito del progetto internazionale di sequenziamento del genoma del pomodoro è stato fondato un gruppo di lavoro, l'iTAG (international Tomato Annotation Group), che vede coinvolte unità di bioinformatica pro-

venienti da Europa, Asia e Stati Uniti, il cui obbiettivo finale è quello di produrre un'annotazione omogenea e attendibile del genoma mediante uno sforzo condiviso e distribuito tra i vari partecipanti.

Attualmente l'iTAG lavora sull'insieme di sequenze BAC sequenziate nell'ambito del progetto genoma e distribuite via web sia dal *Solanaceae Genomics Network* (SGN; <http://solgenomics.net/>) sia dalla banca dati GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

La procedura di annotazione implementata *ad hoc* è anche adatta per analizzare le sequenze genomiche che cominciano a essere prodotte mediante tecnologie di nuova generazione e secondo un approccio WGS.

I passaggi dell'analisi prevista al momento sono descritti di seguito: 1) allineamento di sequenze espresse lungo le sequenze genomiche e definizione di una collezione attendibile di geni modello; 2) predizione di geni mediante la piattaforma integrata EuGene (Foissac et al., 2003; 2008) e annotazione funzionale dei geni predetti (Blake et al., 2002; Mulder et al., 2007; Quevillon et al., 2005); 3) identificazione di geni non codificanti mRNA mediante metodi appropriati. Nell'ambito di questo sforzo distribuito, il nostro gruppo è coinvolto nell'organizzazione e catalogazione di collezioni EST (Expressed Sequence Tag) di pomodoro e di altre specie di Solanaceae da allineare lungo i BAC (D'Agostino et al., 2007a; 2009), e in secondo luogo nella definizione di una collezione attendibile di geni modello utile nell'addestramento dei programmi di predizione genica *ab initio* (Yao et al., 2005; D'Agostino et al., 2007b).

LA BANCA DATI SOLEST: UN APPROCCIO "ONE-STOP-SHOP" PER LO STUDIO DEL TRASCRITTOMA DELLE SOLANACEAE

Sebbene siano al momento in corso sforzi per il sequenziamento del genoma di pomodoro (Mueller et al., 2009), patata (Visser et al., 2009) e tabacco (<http://www.tobaccogenome.org/>), gran parte dei dati di sequenza disponibili per le Solanaceae sono costituiti da collezioni di EST.

Le EST rappresentano brevi frammenti di sequenze espresse derivate dal sequenziamento *single pass* di librerie di cDNA. Queste ultime sono ottenute a partire da un estratto cellulare di mRNA il quale viene trasformato in DNA a doppio filamento (cDNA) e inserito in un vettore batterico.

Con l'obiettivo di contribuire all'analisi trascrittomica delle Solanaceae, sono state collezionate sequenze EST e mRNA provenienti da differenti specie sia coltivate sia selvatiche.

Sfruttando una procedura automatizzata da noi progettata *ad hoc*, (Par-PEST; D'Agostino et al., 2005) le EST in ciascuna collezione sono processate per rimuovere eventuali sequenze contaminanti e individuare e mascherare sequenze ripetute; sono quindi raggruppate in *cluster*, ognuno dei quali rappresenta un gene; infine le sequenze EST in ciascun *cluster* sono opportunamente assemblate nel tentativo di ricostruire l'intera sequenza dell'mRNA dal quale le EST derivano. La procedura di '*assemblaggio*' può produrre *tentative consensus sequences* (TCs), ossia assemblati di due o più sequenze, e singoletti, ovvero sequenze non incluse in alcun TC. Il numero risultante di trascritti (TCs + singoletti) definiti dalla strategia descritta è, quindi, sottoposto ad annotazione funzionale, ossia a una procedura per l'identificazione della regione codificante per la proteina, mediante confronto con la banca dati proteica UniProt/Swiss-prot (<http://www.uniprot.org>). La descrizione della funzione di ciascun trascritto include, laddove possibile, le ontologie geniche, che sono ricavate da un vocabolario controllato e strutturato per la descrizione dei prodotti genici (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>); la classificazione e nomenclatura degli enzimi ricavate dalla banca dati ENZYME (<http://www.geneontology.org/>) e l'associazione di ciascun trascritto codificante un enzima alle mappe metaboliche già organizzate nella banca dati KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), da noi considerata come riferimento.

Le sequenze EST grezze, i dati intermedi e le informazioni relative al raggruppamento e assemblaggio delle sequenze e all'annotazione funzionale sono stati raccolti in una banca dati relazionale. È stata implementata una interfaccia grafica per consultare il database (<http://biosrv.cab.unina.it/solest-db>) che comprende anche menù ad albero per una facile interrogazione da parte dell'utente.

Le sequenze EST di Solanaceae sono state collezionate ed analizzate con lo scopo di campionare il trascrittoma delle Solanaceae fornendo un ampio catalogo di trascritti e con lo scopo di contribuire in maniera determinante all'annotazione delle sequenze genomiche in corso di produzione per pomodoro e per altre Solanaceae evidenziandone le caratteristiche strutturali e funzionali.

ANNOTAZIONE DI SEQUENZE GENOMICHE

In qualità di membri dell'iTAG, abbiamo implementato una procedura automatizzata, su piattaforma di calcolo parallelo, per l'annotazione delle sequenze BAC rese disponibili alla comunità scientifica attraverso la banca dati GenBank. Tale procedura consente quotidianamente di scaricare e analizzare

ogni nuova sequenza BAC disponibile e allineare lungo di essa le sequenze EST collezionate nella banca dati SolEST (D'Agostino et al., 2009) e i corrispondenti *tentative consensus* derivanti dall'assemblaggio di sequenze EST mediante la procedura ParPEST (D'Agostino et al., 2005). Sono allineate, peraltro, lungo il genoma: i) differenti collezioni di sequenze ripetute caratteristiche della famiglia delle Solanaceae (Plant Repeat Databases at Michigan State University, Ouyang and Buell, 2004; the RepBase.13.06, Jurka et al., 2005; SGN tomato UniRepeats (ftp://ftp.sgn.cornell.edu/tomato_genome/repeats/); ii) le sequenze proteiche collezionate dalla banca dati UniProt; iii) le sequenze di RNA appartenenti alla pianta modello *Arabidopsis thaliana*.

Tutte le sequenze BAC di pomodoro, annotate con i dati descritti, sono raccolte e catalogate in una banca dati progettata *ad hoc* e sono visualizzabili tramite il software Genome Browser (Stein et al., 2002).

Con l'intento di rendere pubblico e maggiormente fruibile il servizio non solo ai partecipanti al progetto genoma, ma anche a tutta la comunità scientifica interessata alla genomica della famiglia delle Solanaceae, è stata implementata un'interfaccia grafica per consentire la consultazione dei risultati da noi prodotti accessibile al seguente indirizzo <http://biosrv.cab.unina.it/GBrowse>.

La costruzione di pagine web dinamiche consente un accesso guidato ai dati genomici catalogati. Nella pagina iniziale (<http://biosrv.cab.unina.it/GBrowse>) è possibile consultare l'elenco delle sequenze BAC annotate divise per cromosoma di appartenenza, e organizzate in una struttura ad albero di facile navigazione. Per ciascun BAC è possibile visualizzare: i) lo stato di sequenziamento, tramite l'indice HTGS (High Throughput Genome Sequence; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HTGS/examples.html>), compreso tra 1 (stadio preliminare) e 3 (stadio finale); ii) l'accesso diretto alla pagina descrittiva nella banca dati GenBank; iii) alcune statistiche generali riguardo le informazioni allineate su ciascun BAC, ad esempio numero di EST e TC, per ogni specie, e calcolo della densità genica (espressa come percentuale di nucleotidi della sequenza genomica che risultano allineati alle EST).

Il contributo alla definizione dei geni modello necessari per l'addestramento dei programmi di predizione genica *ab initio* è stato quello di concepire e implementare un programma, GeneModelEST (D'Agostino et al., 2007b), che automatizzasse la procedura, tradizionalmente "manuale", della valutazione delle regioni geniche (la struttura esoni, introni, CDS, UTR) del genoma del pomodoro a partire dai dati di espressione genica e dell'identificazione di trascritti alternativi in una regione genomica.

ISOL@: UNIONE, INTEGRAZIONE E CONVERGENZA COME ELEMENTI FONDANTI
PER MUOVERE I PRIMI PASSI VERSO LA BIOLOGIA DEI SISTEMI

ISOL@ nasce con l'obiettivo di sviluppare una piattaforma che integri dati da diversi livelli informativi riguardanti la funzionalità cellulare. È stata pertanto progettata come un ambiente computazionale multi-livello e si compone di diverse risorse dati nonché degli strumenti necessari a migliorarne la qualità, estrarne il contenuto informativo e sfruttarne la loro integrazione in modo efficiente.

ISOL@ è al momento costituita da due livelli principali: genoma e trascrittoma ed è predisposta per accogliere dati di proteomica e metabolomica. L'elemento fondante del '*livello genoma*' è rappresentato dalle sequenze genomiche di *Solanum lycopersicum* prodotte nell'ambito del consorzio internazionale per il sequenziamento del genoma del pomodoro. Quest'ultimo è predisposto per integrare genomi di altre Solanaceae (Di Filippo et al., 2009). Invece, l'elemento base del '*livello trascrittoma*' è costituito dalle collezioni complete di EST da diverse specie di Solanaceae.

È possibile interrogare la piattaforma per ottenere informazioni da ciascun livello mediante punti di accesso indipendenti, consentendo di esplorare in via preliminare il genoma di pomodoro e le annotazioni ottenute o di indagare il trascrittoma esaminando le collezioni EST. Un *cross-link* tra i due livelli garantisce la condivisione delle risorse dati.

La creazione di una piattaforma come ISOL@ non può prescindere dalla necessità di processare i dati grezzi e riconciliarli in modo da aumentarne il contenuto informativo e renderne possibile l'integrazione. Pertanto, sono parte integrante della piattaforma diversi strumenti bioinformatici di base deputati a questo scopo e anche strumenti da noi definiti '*ausiliari*' i quali, sfruttando la sinergia tra i livelli, producono informazione di valore aggiunto. La costruzione di un catalogo attendibile di geni modello mediante la progettazione del software GeneModelEST (D'Agostino et al., 2007b), ad esempio, è proprio dovuta allo sfruttamento della effettiva integrazione dei principali livelli della piattaforma ISOL@.

ISOL@ è concepita come una piattaforma in evoluzione, flessibile per adeguarsi allo sviluppo di nuove tecnologie. Infatti si tratta di una piattaforma che tiene conto della continua crescita dei dati, nonché dei nuovi metodi sperimentali *high-throughput*. A tal fine, è necessaria una continua implementazione di nuovi metodi computazionali in grado di rendere disponibili al meglio informazioni utili alla comunità scientifica interessata in attesa del rilascio di un'annotazione ufficiale da parte dell'iTAG. Una bozza preliminare e incompleta del genoma di pomodoro ne rivela una struttura tipica dei cromosomi.

Oltre a fornire una annotazione del genoma aggiornata quotidianamente, ISOL@ consente di effettuare analisi preliminari sulla struttura del genoma nascente. Infatti, l'integrazione delle collezioni di dati di genomica e trascrittomica nella piattaforma ISOL@ è stata sfruttata per esaminare l'organizzazione strutturale del genoma di pomodoro, andando ad analizzarne la distribuzione dei geni (definiti grazie all'allineamento delle EST lungo il genoma) e della frazione di DNA ripetuto intersperso. Il *genome browser* (<http://biosrv.cab.unina.it/GBrowse>) consente, infatti, anche la visualizzazione delle sequenze di DNA ripetuto lungo il genoma, grazie all'utilizzo di collezioni di riferimento.

In particolare, sono stati analizzati cinque dei dodici cromosomi per cui è stato ricostruita una ossatura preliminare (*Minimum Tiling Path*). In figura 1 sono mostrati gli istogrammi che indicano, per ognuno dei BAC ordinati lungo i cinque cromosomi suddetti, la distribuzione della percentuale di copertura nucleotidica di geni (in nero) e di sequenze ripetute (in grigio). In questi casi, infatti, è possibile seguire la variazione della composizione lungo i cromosomi, andando a distinguere regioni relativamente più ricche in sequenze ripetute e altre più ricche in geni. Grazie anche al supporto di riferimenti sperimentali, si possono individuare porzioni eterocromatiche ed eucromatiche e caratterizzarle mediante l'analisi della sequenza. È possibile riconoscere anche la regione pericentromerica, che è rappresentata dal blocco più ampio di sequenze ricche in DNA ripetuto che si ritrova lungo i cromosomi ed è circoscritta, in figura 1, da rettangoli con linea discontinua. Per i cromosomi più densi di informazioni, ossia quelli per i quali i BAC sequenziati sono molti, è possibile discriminare regioni ricche in DNA ripetuto localizzate esternamente al pericentromero, le quali non sempre si evincono attraverso le comuni analisi sperimentali.

Le analisi, al momento in corso, delle regioni più ricche di sequenze ripetute indicano che esse sono composte principalmente da sequenze retrotrasponibili. La variazione delle varie classi di dette sequenze lungo i cromosomi sembra essere conservata lungo ciascun cromosoma, delineando un andamento che potrebbe risultare tipico dell'intero genoma del pomodoro.

La presenza di una considerevole porzione di DNA ripetuto nelle sequenze genomiche ha messo inoltre in luce la difficoltà nel selezionare in modo affidabile la regione eucromatica, sulla quale si era focalizzato inizialmente il sequenziamento. Ciò ha dato il via all'iniziativa mirata al completamento del sequenziamento del genoma attraverso un approccio WGS, che dovrà di sicuro avvalersi delle informazioni provenienti dall'approccio *'BAC-by BAC'*

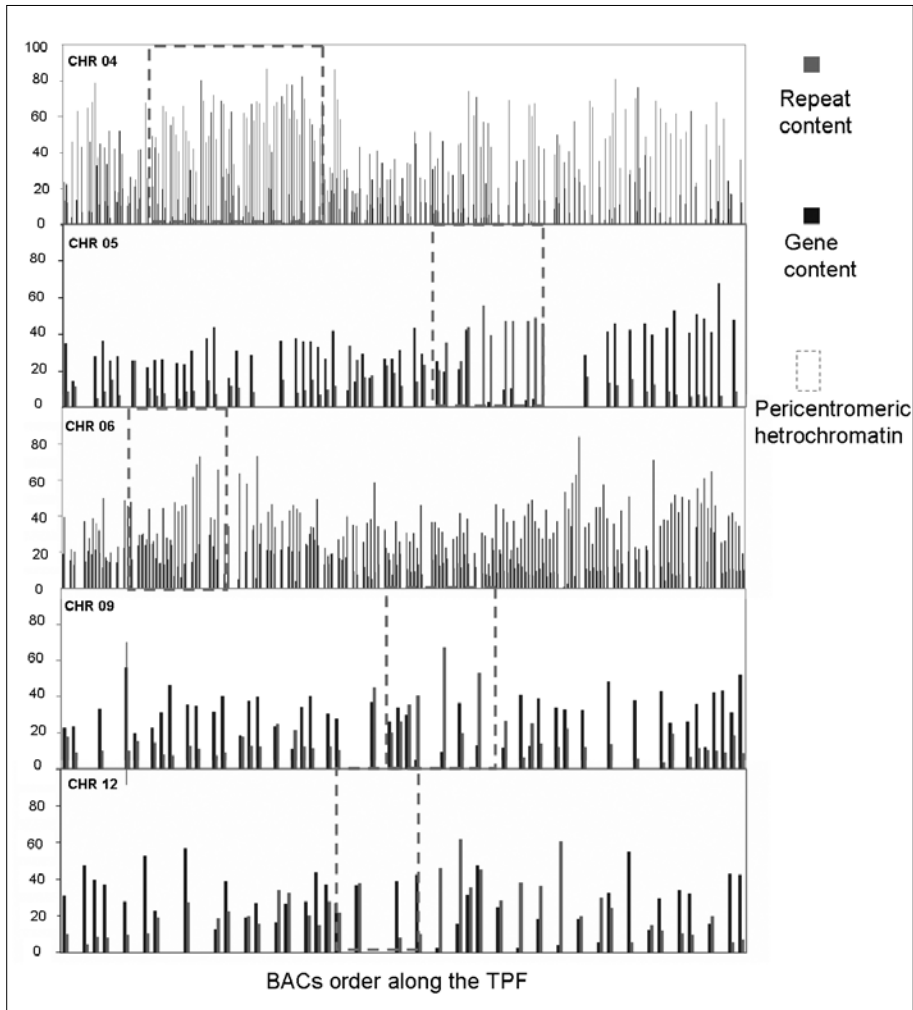


Fig. 1 *Analisi della composizione in geni e sequenze ripetute lungo cinque cromosomi di pomodoro. Ciascun istogramma riporta la percentuale di copertura nucleotidica delle EST (barre nere) e delle sequenze ripetute (barre grigie) per BAC. L'analisi è stata effettuata per i cromosomi di pomodoro (4, 5, 6, 9 e 12) per i quali è stato assemblato un 'Minimum Tiling Path'. I rettangoli selezionati in grigio includono la regione eterocromatica pericentromerica. Essa è stata determinata utilizzando le informazioni disponibili presso il sito del SGN [ftp://ftp.sgn.cornell.edu/tomato_genome/seedbacs/eu-hetero-limit-markers.txt](http://ftp.sgn.cornell.edu/tomato_genome/seedbacs/eu-hetero-limit-markers.txt), riguardanti la localizzazione dei marcatori molecolari e corrispondenti BAC che individuano le regioni limite tra eucromatina ed eterocromatina*

per una corretta ricostruzione della sequenza di ciascun cromosoma e per assemblare in maniera attendibile le sequenze ripetute.

CONCLUSIONI

Nell'era delle scienze '-omiche' è necessario allestire metodologie bioinformatiche idonee a consentire un'analisi integrata dei dati. Queste devono essere mirate a gestire l'insieme dei dati al fine di definire proprietà emergenti da una visione 'olistica' altrimenti non evidenziabili mediante analisi particolarizzate e relative a specifici aspetti della funzionalità cellulare.

In particolare, nell'ambito della genomica vegetale, la spinta alla caratterizzazione molecolare di differenze e similarità tra specie distinte, ha portato alla organizzazione di consorzi internazionali focalizzati sulla definizione della struttura genomica. Tali progetti, mirati all'analisi di una o più specie, generalmente di interesse agroalimentare, come nel caso del progetto SOL, contribuiscono alla definizione di informazioni utili per applicazioni immediate, come l'identificazione di geni di interesse o di marcatori molecolari utili alla diagnostica e al monitoraggio, nonché al miglioramento genetico, e rappresentano il punto di partenza per approcci ancora più ambiziosi. Ad esempio, la disponibilità della struttura del genoma è fondamentale per la comprensione dei complessi meccanismi che contribuiscono all'affermazione di fenotipi estremamente eterogenei in specie con genomi conservati. Inoltre, è utile per comprendere i meccanismi che conferiscono plasticità al genoma vegetale, e che si riflettono nella sopravvivenza di ibridi e nella tolleranza di fenomeni di temporanea poliploidizzazione. Inoltre, uno studio di genomi che si avvale di tecnologie sempre più avanzate è il punto di partenza per la comprensione di fenomeni di estremo interesse nell'ambito della genomica agraria come ad esempio l'eterosi.

Abbiamo progettato ISOL@ per rispondere alle esigenze del progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro, contribuendo agli sforzi internazionali con una piattaforma bioinformatica che consentisse, da subito, l'accesso all'annotazione delle sequenze prodotte. Tale strategia si è rivelata utile a livello intenzionale dato che si è ancora in attesa dell'annotazione ufficiale da parte del gruppo iTAG. Peraltro, il nostro scopo era quello di progettare e testare l'efficienza di un sistema bioinformatico complesso utile per le attività che la ricerca genomica implica.

In particolare il progetto SOL rappresenta una sfida in quanto richiede la progettazione di una piattaforma flessibile ed espandibile, in grado di gestire dati da più di un genoma. A tal fine ISOL@ è già predisposta per poter in-

cludere altri genomi nell'ambito della famiglia delle Solanaceae, come patata e tabacco. Inoltre, una piattaforma multilivello, in grado di integrare e gestire dati da genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica, rappresenta un primo risultato per la risoluzione di problemi tipici della biologia dei sistemi.

Necessaria sarà quindi l'evoluzione della piattaforma verso l'integrazione di dati di fenotipizzazione, di cui al momento esistono già risorse per pomodoro e per altre Solanaceae. Anche in tal caso, la gestione integrata di queste informazioni e di quelle raccolte in una piattaforma come ISOL@, con dati da molteplici livelli della funzionalità cellulare, sarà utile per descrivere adeguatamente le relazione fenotipo-genotipo, ed evidenziare l'associazione tra caratteristiche di interesse ed i processi molecolari che le determinano.

RIASSUNTO

L'esigenza di ampliare le attuali conoscenze sui meccanismi genetici che determinano la variabilità fenotipica e l'adattamento a differenti nicchie ecologiche della famiglia delle Solanaceae ha portato alla realizzazione del Progetto Internazionale Genoma delle Solanaceae (SOL). A tal fine, il pomodoro (*S. lycopersicum*) è stato scelto come sistema modello e attualmente ne è in corso il sequenziamento della regione eucromatica del genoma. I dati provenienti dalle analisi del trascrittoma delle Solanaceae sono stato collezionati in una piattaforma multilivello (ISOL@) per permettere la loro integrazione con le sequenze genomiche di pomodoro al momento disponibili. Sebbene la sequenza della regione eucromatica del genoma di pomodoro sia meno di un quarto del totale, la realizzazione di ISOL@ ha permesso di effettuare una prima esplorazione del genoma di pomodoro analizzando la composizione in geni ed elementi ripetuti e delineando una tipica organizzazione strutturale. ISOL@ è stata predisposta per collezionare altri genomi e per integrare dati ottenuti con differenti tipi di tecnologie, aprendo la prospettiva a una analisi comparativa tra i genomi di Solanaceae. Inoltre, una piattaforma multilivello, in grado di integrare e gestire dati da genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica, rappresenta un primo risultato per la risoluzione di problemi tipici della biologia dei sistemi offrendo nuovi metodi per l'analisi genomica di organismi di interesse agrario.

ABSTRACT

The need to enhance our knowledge on the genetic mechanisms which determine Solanaceae diversification and adaptation to extremely different environments has led scientific efforts to be gathered under the International Solanaceae (SOL) Genome Project. Tomato (*S. lycopersicum*) has been chosen as the reference genome and its sequencing, which is mainly focused on the euchromatin region, is currently ongoing. The Solanaceae transcriptome data have been collected within a multilevel platform (ISOL@), to integrate them with the tomato genome sequences. Although the tomato genome sequences currently available are only one quarter of the total DNA amount, the integration of

genomics and transcriptomics data in ISOL@ permitted a preliminary investigation of the genome in terms of gene and repeat content, revealing a typical design of the genome structure. ISOL@ was set up to include data from other sources, also obtained by next generation sequencing, paving the way for comparative analyses among emerging Solanaceae genomes. In addition, such a platform, built to integrate and manage genomics, transcriptomics, proteomic and metabolomic data, represents a first step to approach a system biology view offering novel methodologies for genome analyses of species of agriculture interest.

REFERENZE

- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (AGI) (2000): *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*, «Nature», 408, pp. 796-815.
- ARUMUGANATHAN K., SLATTERY J.P., TANKSLEY S.D., EARLE E.D. (1991): *Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato*, «Theor Appl Genet», 82, pp. 101.
- BLAKE J.A HARRIS M.A. (2002): *The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and ex-expression analysis*, «Curr Protoc Bioinformatics» Chapter 7, Unit 7.2.
- CHIUSANO M.L., D'AGOSTINO N., TRAINI A., LICCIARDELLO C., RAIMONDO E., AVERSA-NO M. (2008): *ISOL@: an Italian SOLAnaceae genomics resource*, «BMC Bioinformatics», 9, Suppl 2, S7.
- D'AGOSTINO N., AVERSA M., CHIUSANO M.L. (2005): *ParPEST: a pipeline for EST data analysis based on parallel computing*, «BMC Bioinformatics», 6 Suppl 4, S9.
- D'AGOSTINO N. CHIUSANO M.L., AVERSA M. (2007a): *TomatEST database: in silico exploitation of EST data to explore expression patterns in tomato species*, «Nucleic Acids Res.», 35 (Database issue), pp. D901-D905.
- D'AGOSTINO N., TRAINI A., FRUSCIANTE L., CHIUSANO M.L. (2007b): *Gene models from ESTs (GeneModelEST): an application on the Solanum lycopersicum genome*, «BMC Bioinformatics», 8 (Suppl 1), pp. S9.
- D'AGOSTINO N., TRAINI A., FRUSCIANTE L., CHIUSANO M.L. (2009): *SolEST database: a "one-stop shop" approach to the study of Solanaceae transcriptomes*, «BMC Plant Biology», in press.
- DE JONG J.H. (1998): *High resolution FISH reveals the molecular and chromosomal organization of repetitive sequences in tomato*, «Cytogenet Cell Genet.», 81, pp. 104.
- DE JONG J.H., ZHONG X.B., FRANSZ P.F., WENNEKES-VAN EDEN J., JACOBSEN E., ZABEL P.E. (2000): *High resolution FISH reveals the molecular and chromosomal organisation of repetitive sequences of individual tomato chromosomes*, in Chromosomes Today, 13 voll., Edited by Olmo E and Redi, CA. Basel Switzerland: Birkha" user Verlag, pp. 267-275.
- DI FILIPPO M., MASELLI V., TRAINI A., D'AGOSTINO N., FRUSCIANTE L., CHIUSANO M.L. (2009): *Solanaceae genomics: maybe we can*. 53rd SIGA Annual Congress. (Turin) Italy, September 16-19, 2009.
- FOISSAC S., BARDOU P., MOISAN A., CROS M.J., SCHIEUX T. (2003): *EUGENE'HOM: a generic similarity-based gene finder using multiple homologous sequences*, «Nucleic Acids Res.», 31(13), pp. 3742-3745.
- FOISSAC S., GOUZY J., ROMBAUTS S., MATHE C., AMSELEM J., STERCK L., DE PEER Y.V.,

- ROUZE P., SCHIEX T. (2008): *Genome Annotation in Plants and Fungi: EuGene as a model platform*, «Curt Bioinformatics», 3, pp. 87-97.
- FULTON T.M., VAN DER HOEVEN R., EANNETTA N.T., TANKSLEY S.D. (2002): *Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants*, «Plant Cell», 14, pp. 1457-1467.
- JURKA J., KOHANY O., ADAM PAVLICEK A., KAPITONOV V.V., JURKA M.V. (2004): *Duplication, coclustering, and selection of human Alu retrotransposons*, «Proc Natl Acad Sci USA», 101(5), pp. 1268-72.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (2005): *The map-based sequence of the rice genome*, «Nature», 436, pp. 793-800.
- MULDER N.J., APWEILER R., ATTWOOD T.K., BAIROCH A., BATEMAN A., BINNS D., BORK P., BULLARD V., CERUTTI L., COPLEY R., COURCELLE E., DAS U., DAUGHERTY L., DIBLEY M., FINN R., FLEISCHMANN W., GOUGH J., HAFT D., HULO N., HUNTER S., KAHN D., KANAPIN A., KEJARIWAL A., LABARGA A., LANGENDIJK-GENEVAUX P.S., LONSDALE D., LOPEZ R., LETUNIC I., MADERA M., MASLEN J., MCANULLA C., MCDOWALL J., MISTRY J., MITCHELL A., NIKOLSKAYA A.N., ORCHARD S., ORENGO C., PETRYSZAK R., SELENGUT J.D., SIGRIST C.J., THOMAS P.D., VALENTIN F., WILSON D., WU C.H., YEATS C. (2007): *New developments in the InterPro database*, «Nucleic Acids Res.», 35 (Database issue), pp. D224-D228.
- MUELLER L.A., SOLOW T.H., TAYLOR N., SKWARECKI B., BUELS R., BINNS J., LIN C., WRIGHT M.H., AHRENS R., WANG Y., HERBST E.V., KEYDER E.R., MENDA N., ZAMIR D., TANKSLEY S.D. (2005a): *The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond*, «Plant Physiology», 138(3), pp. 1310-1317.
- MUELLER L.A., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J., VAN ECK J., STACK S., CHOI D., KIM B.D., CHEN M., CHENG Z., LI C., LING H., XUE Y., SEYMOUR G., BISHOP G., BRYAN G., SHARMA R., KHURANA J., TYAGI A., CHATTOPADHYAY D., SINGH N.K., STIEKEMA W., LINDHOUT P., JESSE T., LANKHORST R.K., BOUZAYEN M., SHIBATA D., TABATA S., GRANELL A., BOTELLA M.A., GIULIANO G., FRUSCIANTE L., CAUSSE M., ZAMIR D. (2005b): *The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL)*, «Comparative and Functional Genomics», 6, pp. 153-158.
- MUELLER L.A., LANKHORST R.K., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J., WHITE R., VREBALOV J., FEI Z., VAN ECK J., BUELS R., MILLS A.A., MENDA N., TECLE I.Y., BOMBARELY A., STACK S., ROYER S.M., CHANG S.B., SHEARER L.A., KIM B.D., JO S.H., HUR C.G., CHOI D., LI C.B., ZHAO J., JIANG H., GENG Y., DAI Y., FAN H., CHEN J., LU F., SHI J., SUN S., CHEN J., YANG X., LU C., CHEN M., CHENG Z., LI C., LING H., XUE Y., WANG Y., SEYMOUR G.B., BISHOP G.J., BRYAN G., ROGERS J., SIMS S., BUTCHER S., BUCHAN D., ABBOTT J., BEASLEY H., NICHOLSON C., RIDDLE C., HUMPHRAY S., MCLAREN K., MATHUR S., VYAS S., SOLANKE A.U., KUMAR R., GUPTA V., SHARMA A.K., KHURANA P., KHURANA J.P., TYAGI A., SARITA, CHOWDHURY P., SHRIDHAR S., CHATTOPADHYAY D., PANDIT A., SINGH P., KUMAR A., DIXIT R., SINGH A., PRAVEEN S., DALAL V., YADAV M., GHAZI I.A., GAIKWAD K., SHARMA T.R., MOHAPATRA T., SINGH N.K., SZINAY D., DE JONG H., PETERS S., VAN STAVEREN M., DATEMA E., FIERIS M.W.E.J., VAN HAM R.C.H.J., LINDHOUT P., PHILIPPOT M., FRASSE P., REGAD F., ZOUINE M., BOUZAYEN M., ASAMIZU E., SATO S., FUKUOKA H., TABATA S., SHIBATA D., BOTELLA M.A., PEREZ-ALONSO M., FERNANDEZ-PEDROSA V., OSORIO S., MICO A., GRANELL A., ZHANG Z., HE J., HUANG S., DU Y., QU D., LIU L., LIU D., WANG J., YE Z., YANG W., WANG G., VEZZI A., TODESCO S., VALLE G., FALCONE G., PIETRELLA M., GIULIANO G., GRANDILLO S., TRAINI A., D'AGOSTINO N., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., BARONE

- A., FRUSCIANTE L., SCHOOF H., JÖCKER A., BRUGGMANN R., SPANNAGL M., MAYER K.X.F., GUIGÓ R., CAMARA F., ROMBAUTS S., FAWCETT J.A., VAN DE PEER Y., KNAPP S., ZAMIR D. & STIEKEMA W.A. (2009): *A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence*, «The Plant Genome», 2(1), pp. 78-92.
- QUEVILLON E., SILVENTOINEN V., PILLAI S., HARTE N., MULDER N., APWEILER R., LOPEZ R. (2005): *InterProScan: protein domains identifier*, «Nucleic Acids Res.», 33 (Web Server Issue):W116-W120.
- OUYANG S. AND BUELL R.C. (2004): *The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants*, «Nucleic Acids Res.», 32(Database issue), D360-3.
- PETERSON D.G., PRICE H.J., JOHNSON J.S., STACK S.M. (1996): *DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (Lycopersicon esculentum) pachytene chromosomes*, «Genome», 39, pp. 77-82.
- STEIN L.D., MUNGALL C., SHU S., CAUDY M., MANGONE M., DAY A., NICKERSON E., STAJICH J.E., HARRIS T.W., ARVA A., LEWIS S. (2002): *The generic genome browser: a building block for a model organism system database*, «Genome Res.», 12, pp. 1599-1610.
- VAN DER HOEVEN R., RONNING C., GIOVANNONI J., GREGORY MARTIN G., TANKSLEY S. (2002): *Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing*, «The Plant Cell», 14, pp. 1441-1456.
- VISSER R.G.F., BACHEM C.W.B., DE BOER J.M., BRYAN G.J., CHAKRABATI S.K., FEINGOLD S., GROMADKA R., VAN HAM R.C.H.J., HUANG S., JACOBS J.M.E., KUZNETSOV B., DE MELO P.E., MILBOURNE D., ORJEDA G., SAGREDO B., TANG X. (2009): *Sequencing the Potato Genome: Outline and First Results to Come from the Elucidation of the Sequence of the World's Third Most Important Food Crop*, «American Journal of Potato Res.», DOI 10.1007/s12230-009-9097-8.
- YAO H., GUO L., FU Y., BORSUK L.A., WEN T.J., SKIBBE D.S., CUI X.Q., SCHEFFLER B.E., CAO J., EMRICH S.J., ASHLOCK D.A., SCHNABLE P.S. (2005): *Evaluation of five ab initio gene prediction programs for the discovery of maize genes*, «Plant Mol Biol.», 57(3), pp. 445-60.

Commento di chiusura al Convegno

L'agricoltura italiana è stata fatta carico, negli ultimi lustri, di una crescente responsabilità paesaggistico-ricreativo-ambientale che ne ha, in buona parte, depontenziato il ruolo produttivo tradizionale e, in particolare, quello agroalimentare che è stato, da sempre, preponderante. D'altra parte il nostro paese ha bisogno di elevate quantità di prodotti alimentari che, frequentemente, se ottenuti nel nostro territorio possono anche vantare parametri qualitativi assai elevati se non esclusivi. Questo è certamente il caso del pomodoro e del frumento duro ed è quindi stato per me motivo di particolare soddisfazione seguire i lavori conclusivi dell'attività scientifica di due progetti, AgroGen e GenoPOM, che sono stati realizzati con la partecipazione di importanti gruppi della nostra comunità scientifica.

L'altro elemento di soddisfazione riguarda il livello scientifico delle indagini effettuate; infatti le attività di laboratorio sono state realizzate tramite tecniche innovative, del tutto in linea con quanto si sta facendo nei laboratori dei paesi più avanzati; ma è importante rilevare che le attività di ricerca, che avrebbero già un valore importante come acquisizione di avanzamento delle conoscenze, sono state utilizzate nei due progetti stessi per trasferire in campo, cioè nelle piante da coltivare, le caratteristiche desiderate. Sono stati identificati, infatti, geni e marcatori molecolari associati a caratteri di rilevanza agronomica; conseguentemente le società private che hanno partecipato al progetto potranno avvantaggiarsi di queste novità per procedere al loro uso sia per il miglioramento genetico che per definire vere strategie di tracciabilità basata su parametri molecolari. È, quest'ultima, una forma di tracciabilità

* *Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Laboratorio di Fisiologia Vegetale, Università degli Studi di Pisa*

assai adeguata per la descrizione qualitativa che altrimenti diventa molto discutibile e indefinita.

D'altra parte i progetti di miglioramento genetico già da tempo utilizzano marcatori molecolari per la MAS (marked assisted selection), ma le scoperte scientifiche e tecnologiche hanno subito in questi anni un tal processo di accelerazione per cui non è più possibile continuare con pur benemeriti ed efficaci metodi validi sino a non molto tempo addietro. Ora si sono affermate nel mondo le tecnologie *high-through-put* ed è con tali strumenti che si affrontano gli obiettivi di ricerca. La ricerca in biologia e quindi anche sulle piante coltivate, è cambiata di scala: come ha ben detto Cattivelli «ciò che si è fatto utilizzando pochi marcatori legati ad alcuni caratteri spesso con una semplice base genetica, sarà sostituito da approccio di *whole genome scanning* in grado di determinare una selezione sulla base dell'intero genoma (*Genome Wide Selection*)».

Con questi due progetti constatiamo la soddisfazione di avere in Italia gruppi competitivi e ben inseriti nel contesto della ricerca internazionale che lascia ben sperare nel futuro, e fa da contraltare a un "clima" generale di pessimismo circa l'attività di ricerca nel nostro paese.

ABSTRACT

I have been particularly honoured to participate at the conclusive workshop of the two scientific projects AgroGen and GenoPOM. Their work was carried out by relevant teams of our scientific community with the object of increasing the quality of two traditional Italian food products: wheat and tomato.

The level of the experimentation was outstanding, absolutely on the forefront of plant research. Moreover the peculiarity of these projects has been the suitability of the results of such elegant work to be transferred to the industry for practical use in programs of plant breeding with the aim of obtaining cultivars with better qualitative performances.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nel giugno 2010

