

Approcci integrati per lo studio dei
meccanismi fisiologici e molecolari di
risposta agli stress idrici e termici in
pomodoro

Paolo Iovieno

Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica– XXV ciclo
Indirizzo Miglioramento Genetico
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica – XXV ciclo
Indirizzo Miglioramento Genetico
Università di Napoli Federico II



Approcci integrati per lo studio dei
meccanismi fisiologici e molecolari di risposta
agli stress idrici e termici in pomodoro

Dottorando:	Paolo Iovieno
Relatore:	Prof. Luigi Frusciante
Co-relatore:	Dott.ssa Stefania Grillo
Coordinatore:	Prof. Matteo Lorito

A mio padre

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Gli stress ambientali e le produzioni agricole	1
1.2	Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress idrico	2
1.3	Geni coinvolti nella risposta a stress osmotici	3
1.3.1	Geni Funzionali	3
1.3.2	Geni Regolatori	6
1.4	Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress da alte temperature	8
1.5	Hsf e Hsp: componenti chiave nella risposta cellulare al heat stress	10
1.5.1	Caratteristiche strutturali e funzionali delle proteine Hsf e meccanismo di attivazione	10
1.5.2	Heat shock proteins (HSPs)	13
1.5.3	Le <i>small heat shock proteins</i> (sHSP)	14
1.6	Il pomodoro: una specie di grande importanza economica	17
1.6.1	La genomica del pomodoro	18
1.7	Scopo e Contenuto della tesi	22
2	MATERIALI E METODI	26
2.1	Allevamento di diversi genotipi di pomodoro in condizioni di ridotti apporti idrici	26
2.1.2	Allevamento di piante di pomodoro in sistemi semi-controllati a due differenti livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata.	26
2.1.2	Allevamento di piante di pomodoro in vaso in condizioni controllo e di stress idrico	26
2.1.3	Contenuto d'umidità relativo del suolo	27
2.1.4	Allevamento di piante di pomodoro in coltura idroponica e imposizione dello stress idrico mediato da PolyEtilenGlicole (PEG)	27
2.2	Analisi Fisiologica	28
2.2.1	Conduttanza stomatica e assimilazione fotosintetica	28
2.2.2	Potenziale idrico fogliare	28
2.2.3	Analisi della fluorescenza massima della clorofilla "a"	28
2.3	Determinazione biometrica	30
2.3.1	Peso fresco e secco di tessuti di pomodoro	30
2.3.2	Area fogliare	30
2.3	Analisi biochimica	30
2.3.1	Determinazione del contenuto di prolina libera	30
2.3.2	Determinazione del contenuto di ABA	31
2.4	Trasformazione di pomodoro	31
2.4.1	Substrati utilizzati	31
2.4.2	Sterilizzazione e germinazione dei semi	32
2.4.3	Coltura di cellule di <i>A. tumefaciens</i> LBA4404	33
2.4.4	Co-coltivazione di espunti e <i>A.tumefaciens</i>	33
2.4.5	Coltura degli espunti	33
2.4.6	Radicazione dei germogli, propagazione in vitro e trasferimento in vivo	34

2.4.7	Allevamento del materiale transgenico	34
2.5	Screening delle piante trasformate	34
2.5.1	Estrazione del DNA genomico e quantificazione	34
2.5.2	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	34
2.6	Studio d'espressione genica	37
2.6.1	Estrazione di RNA totale	37
2.6.2	Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA	37
2.6.3	Sintesi del cDNA	38
2.6.4	Controllo della sintesi del cDNA	39
2.6.5	RT-PCR (<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>) semiquantitativa	39
2.6.6	Real-time PCR (qRT-PCR)	39
2.6.7	Geni analizzati per l'analisi d'espressione in tessuti di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico	40
2.7	Germinazione <i>in vitro</i> e analisi della vitalità di granuli pollinici di pomodoro	42
3	RISULTATI	44
3.1	Caratterizzazione bio-agronomica di genotipi di pomodoro in risposta a ridotti input idrici	44
3.2	Studio dei meccanismi fisiologici e molecolari della risposta a condizioni di stress idrico in pomodoro	47
3.2.1	Caratterizzazione della risposta a condizioni di graduale carenza idrica in diversi genotipi di pomodoro allevati in terreno	47
3.2.1a	Caratterizzazione fisiologica	50
3.2.1b	Caratterizzazione molecolare e biochimica	57
3.2.2	Caratterizzazione della risposta a stress idrico imposto da PolyEtilenGlicole (PEG)	68
3.2.2a	Caratterizzazione fisiologica	68
3.2.2b	Caratterizzazione molecolare e biochimica	71
3.3	Ottenimento di piante transgeniche di pomodoro per la sovra espressione costitutiva e inducibile di geni coinvolti nella risposta a stress termici	83
3.3.1	Sviluppo di vettori binari e ottenimento di piante transgeniche	83
3.3.2	Screening molecolare delle piante transgeniche	87
3.4	Caratterizzazione ed analisi funzionale di piante sovraesprimenti i geni <i>hsp17.6</i> e <i>hsfA2</i>	91
3.4.1	Selezione delle linee trasgeniche	91
3.4.2	Analisi funzionale dei geni <i>hsp17.6</i> e <i>hsfA.2</i> in piante transgeniche di pomodoro	91
3.4.2 a	Analisi dei profili di espressione genica in foglie e antere di e piante OX17.6 ed IND17.6	94
3.4.2.b	Effetto della sovraespressione del gene codificante di <i>hsp17.6</i> sulla vitalità e la germinabilità del polline	99
3.4.2. c	Analisi dei profili di espressione genica in foglie e antere di piante OxHSF e INDHSF	103
3.4.2d	Effetto della sovraespressione di <i>hsfA2</i> sulla vitalità e germinabilità del polline	110
4	DISCUSSIONE	112
4.1	Risposta a segnali di stress ambientali e sviluppo di produzioni sostenibili di pomodoro	112
4.2	Meccanismi fisiologici e molecolari della risposta delle piante a stress idrici di breve e lungo termine	113
4.3	Analisi funzionale di geni coinvolti nella risposta a stress da alte temperature e nei meccanismi di tolleranza in pomodoro	123
5.	CONCLUSIONI	127
6.	BIBLIOGRAFIA	129

Ringraziamenti

1 Introduzione

1.1 Gli stress ambientali e le produzioni agricole.

Gli organismi vegetali sono frequentemente esposti a stress ambientali che determinano condizioni di crescita non ottimali. Scarsa disponibilità idrica, carenza o eccesso di sali minerali e ioni tossici, scarso fotoperiodo, suoli poco profondi e temperature estreme causano, soprattutto nelle piante agrarie, un calo della produttività e, quindi, danno economico per gli agricoltori (Boyer, 1982). E' stato stimato che solo il 10% dei suoli attualmente coltivati nel mondo hanno condizioni ottimali per la crescita delle piante (Christiansen, 1982). Questi problemi richiedono una revisione delle strategie di utilizzo delle risorse (energia, acqua, ecc) e di approcci innovativi per la costituzione di varietà resistenti o tolleranti agli stress ambientali.

Tra gli stress citati, il deficit idrico e' il singolo stress che ha maggiore impatto sulla produttività delle piante agrarie. Generalmente, condizioni di stress idrico si determinano in maniera graduale, con un progressivo abbassamento della disponibilità di acqua presente nel terreno, dovuto a scarse precipitazioni atmosferiche. Lo stress idrico, tuttavia, può essere cronico, quando causato da un eccesso di sali nel terreno o improvviso, se determinato da condizioni di stress da freddo (Zhu, 2002). Lo stress da alte temperature è invece causato da bruschi innalzamenti di temperatura che possono verificarsi anche in un singolo giorno, riducendo la crescita e lo sviluppo delle piante. Circa il 23% della terra ha temperature medie annuali al di sopra dei 40°C, determinando temperature a livello delle foglie anche di 50°C. Sia lo stress idrico che quello da elevate temperature sono problemi sempre più urgenti, a causa dei cambiamenti climatici in corso. Si stima infatti un progressivo aumento dell'aridità in molte aree del mondo, incluso il bacino del Mediterraneo (Bates *et al.*, 2008). Parallelamente, repentini e imprevedibili aumenti di temperatura, al di sopra delle medie stagionali, sono sempre più frequenti, anche a causa dell'eccesso di diossido di carbonio e altri gas emessi dall'azione antropica (Minorsky *et al.*, 2002).

La carenza idrica a livello citologico determina una disidratazione cellulare, che causa concentrazione dei soluti, cambiamenti nel volume della cellula e nella forma del plasmalemma, diminuzione del gradiente idrico interno, perdita del turgore e dell'integrità di membrana e, infine, denaturazione proteica (Ingram e Bartels, 1996). A livello di pianta intera, tali modificazioni cellulari causano una riduzione della crescita e della produzione. Eventi di heat shock possono provocare in molte specie coltivate danni irreversibili sia nello stadio vegetativo, causando una bassa attività fotosintetica, che in quello riproduttivo, determinando uno scarso sviluppo dei fiori e sterilità del polline, e dunque una ridotta produzione e qualità di semi e frutti

(McKersie *et al.*, 2000). Il miglioramento della tolleranza a stress idrico e ad alte temperature rimane dunque uno degli obiettivi principali degli odierni programmi di miglioramento genetico delle specie coltivate.

La risposta adattativa delle piante a stress idrico e ad alte temperature sono tipici caratteri poligenici, controllati cioè da un network di geni (Knight *et al.*, 1991). Da questo ne deriva la difficoltà di applicare efficaci programmi di miglioramento genetico tradizionale che, ad oggi, ha riportato solo successi limitati per l'ottenimento di piante resistenti o tolleranti stress ambientali (Flowers *et al.*, 1995).

1.2 Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress idrico.

La tolleranza allo stress idrico è il risultato del coordinamento di alterazioni biochimiche e fisiologiche a livello cellulare e molecolare, come la sintesi di acido abscissico (ABA), l'accumulo di vari osmoliti e di proteine con un ruolo di riparazione e protezione in sinergia con un efficiente sistema antiossidante (Cushman *et al.*, 2000).

I meccanismi fisiologici che permettono alle piante di superare la condizione di stress e continuare ad accrescersi durante gli episodi di stress sono stati ampiamente studiati. E' possibile individuare una risposta immediata in cui la cellula avverte il segnale di stress e attiva un pathway di segnalazione che genera una cascata di eventi molecolari e biochimici e in ultimo un ampio cambiamento dell'espressione genica (Ho *et al.*, 1999). Sebbene tale risposta giochi un ruolo essenziale nello stress, essa non è determinante per il raggiungimento di un equilibrio omeostatico. Una esposizione di lunga durata ad uno stress, che aumenta gradualmente in intensità, elicitando cambiamenti nell'espressione genica che assicurano alla cellula non solo la vitalità ma anche un ripristino delle normali attività (Matters and Scandalios, 1989). Un graduale adattamento evita danni determinanti alle cellule, mentre condizioni di *shock* inducono danni spesso irreversibili delle componenti cellulari, principalmente a livello di membrane (Stewart *et al.*, 1989).

I meccanismi sopra citati sono riscontrabili non solo in specie vegetali tipicamente tolleranti (xerofite, alofite) ma anche in piante di specie coltivate che invece sono tipicamente non tolleranti (glicofite). La differenza tra genotipi suscettibili e tolleranti potrebbe risiedere, pertanto, nella capacità di questi ultimi di indurre, in maniera più efficiente e/o più rapidamente, modificazioni biochimiche e fisiologiche, che conferiscono un vantaggio dal punto di vista della tolleranza (Ingram e Bartels, 1996).

Negli ultimi anni, diversi approcci sperimentali hanno portato all'identificazione e descrizione di un enorme numero di geni e funzioni geniche coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante a stress idrico e allo stress osmotico ad esso associato (Bohnert *et al.*, 2006; Yamaguchi-Shinozaki

e Shinozaki, 2006). L'analisi su larga scala del trascrittoma ha, infatti, evidenziato che centinaia di geni sono attivati o repressi in risposta a stress idrico ed osmotico (Bray, 2004; Seki *et al.*, 2004). I diversi geni individuati, oltre ad avere un ruolo diretto nella protezione delle cellule dai danni causati da stress osmotico, sono coinvolti nell'attivazione di circuiti di regolazione che controllano l'intero network della risposta a carenza idrica. I geni coinvolti sono, quindi, generalmente divisi in due categorie: i) geni funzionali, che includono geni implicati nella sintesi di molecole e proteine con ruolo protettivo di processi cellulari cruciali (proteine protettive, enzimi detossificanti, osmoliti compatibili ed altri), isolati da piante e organismi procariotici, e ii) geni regolatori, codificanti proteine regolatrici coinvolte nella percezione e trasduzione del segnale di stress (putativi recettori, calmoduline, calcium-binding proteins, fosfolipasi, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione), che modulano l'espressione dei geni appartenenti alla prima categoria (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Leone *et al.*, 1999).

1.3 Geni coinvolti nella risposta a stress osmotici.

1.3.1 Geni Funzionali.

Diversi geni sono direttamente coinvolti nei meccanismi che permettono alla cellula di adattarsi alla condizione di stress. I prodotti di questi geni sono proteine ed enzimi con ruoli importanti nel ridurre la perdita d'acqua, nella protezione della funzionalità cellulare, nel ripristino dell'omeostasi ionica, nella riparazione dei danni e nella costituzione di un nuovo equilibrio, compatibile con le condizioni di stress.

- *Osmoregolazione cellulare* In condizioni di carenza idrica, le cellule accumulano soluti per aumentare la pressione osmotica intracellulare, evitare la perdita di acqua e mantenere il turgore cellulare. Tali soluti includono ioni come K^+ , Na^+ e soluti organici, quali composti dell'ammonio quaternario (glicinbetaina), amminoacidi (prolina), polioli (inositolo, mannitolo) e zuccheri (saccarosio, trealosio), chiamati anche osmoliti compatibili perché si accumulano in quantità elevate nel citoplasma non interferendo con le normali funzioni cellulari. Geni codificanti per enzimi coinvolti nella biosintesi degli osmoliti sono stati isolati da diverse specie vegetali e micro-organismi, che condividono con le piante alcuni meccanismi osmoprotettivi. Negli ultimi anni la manipolazione dei livelli di osmoliti mediante approcci di ingegneria genetica è stata oggetto di numerose ricerche, i cui risultati principali sono riportati in recenti articoli (Wang *et al.*, 2003; Vinocur e Altman, 2005; Umezawa *et al.*, 2006; Valliyodan e Nguyen, 2006). Il meccanismo di protezione cellulare fornito dagli osmoliti è ancora dibattuto. Oltre al ruolo

nell'aggiustamento osmotico, gli osmoliti (prolina e mannitolo) sembrano svolgere anche altre funzioni, come l'inattivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hong *et al.*, 2000) o la stabilizzazione strutturale delle proteine (Carpenter *et al.*, 1990).

Un'altra classe di proteine con ruolo cruciale per ridurre le perdite di acqua mediante osmoregolazione cellulare sono i trasportatori; proteine che facilitano il movimento dell'acqua attraverso le membrane, come le acquaporine e diverse pompe ioniche, quali ATPasi, proteine antiporto Na^+/H^+ e trasportatori del K^+ .

Le acquaporine (water channel proteins) sono proteine canale che facilitano il passaggio dell'acqua attraverso le membrane, regolando la conduttività idraulica delle membrane (Maurel e Chrispeels, 2001). Molti geni codificanti per acquaporine sono sovraespressi in risposta a stress idrico, tra questi RD28 in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992) e TRAMP (tomato-ripening-associated membrane protein) (Fray *et al.*, 1994).

Il mantenimento dell'omeostasi ionica cellulare, mediante regolazione dell'assorbimento, del sequestro, della esclusione e del trasporto ionico in condizioni di stress è garantito dall'attività di trasportatori, che si accumulano in risposta a stress osmotico associato a carenza idrica. Grazie a questa regolazione, nella cellula è prontamente ristabilito un rapporto equilibrato K^+/Na^+ e mantenuta una bassa concentrazione citosolica di Na^+ (Zhu, 2003). In particolare le piante, in condizioni di stress salino, allontanano lo ione Na^+ dal citosol attraverso meccanismi di esclusione o di compartimentalizzazione nel vacuolo. L' Na^+ , infatti, può essere secreto al di fuori della cellula attraverso proteine antiporto di cui la meglio caratterizzata è quella codificata dal gene *SOS1* (Zhu, 2000). La proteina *SOS1*, la cui attività è indotta in condizioni di stress, è localizzata sulla membrana plasmatica, dove funziona da antiporto Na^+/H^+ (Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001).

Il bilancio K^+/Na^+ , invece, è regolato dall'attività di proteine, note come HKT, che regolano l'ingresso nella cellula di ioni potassio, e sono differenti l'una dall'altra per il grado di specificità con cui discriminano il K^+ dal Na^+ (Serrano, 2001).

- *Protezione delle strutture cellulari e riparo dei danni.* Durante lo stress, differenti prodotti genici si accumulano per proteggere le strutture cellulari e importanti funzioni metaboliche.

La classe di geni più studiata è quella dei geni codificanti proteine LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Questo gruppo di proteine si accumula tipicamente nell'ultima fase dell'embriogenesi o in risposta a disidratazione, basse temperature, eccesso di sali o trattamenti esogeni di ABA, indicando il loro coinvolgimento negli stress osmotici (Close *et al.*, 1989; Gilmour *et al.*, 1992; Almoguera *et al.*, 1993).

Le proteine LEA sono altamente idrofiliche per la loro composizione amminoacidica ricca in glicina e sembra agiscano da chaperonine, per prevenire ripiegamenti proteici errati e impedire la denaturazione proteica (Xiong e Zhu, 2002).

La carenza idrica, come altri tipi di stress ambientali, favorisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), responsabili della produzione di diverse forme di danni cellulari (Smirnov, 1993). Le cellule prevengono gli effetti negativi dello stress ossidativo sintetizzando composti antiossidanti ed enzimi detossificanti, quali la superossido-dismutasi, la glutatione S-transferasi, la ascorbato-ossidasi e la catalasi (Scandalios, 1997).

In particolare la catalasi è essenziale per rimuovere H₂O₂ prodotta nei perossisomi durante la fotorespirazione (Noctor e Foyer 2000).

- *Sintesi, Processamento e Degradazione delle proteine.* Molti geni codificanti per proteine coinvolte nella prevenzione e riparo dei danni cellulari e nella rimozione di composti tossici sono indotti da stress idrico ed osmotico. La sintesi proteica è uno dei processi cellulari più sensibili ai danni da stress idrico. Una componente essenziale della sintesi proteica, il fattore di elongazione 1-alfa si accumula velocemente in cellule vegetali adattate a stress salino (Zhu et al., 1994) e idrico (Costa et al., 1999), e ciò sembra indicare l'esistenza di un meccanismo adattativo di protezione della sintesi proteica.

In risposta a stress osmotico si accumulano, inoltre, anche enzimi coinvolti nella degradazione di proteine danneggiate irreparabilmente dagli effetti dello stress osmotico, come l'ubiquitina e di alcune proteasi (Guerrero et al., 1990), mentre attività opposta hanno gli inibitori di proteasi e le chaperonine, anch'esse indotte in risposta a questo tipo di stress. Mentre la produzione di inibitori di proteasi sembra avere il ruolo di proteggere le proteine dalle proteasi rilasciate a causa di danni nelle membrane intracellulari, le chaperonine sono direttamente coinvolte nel favorire il corretto ripiegamento ed assemblaggio di proteine, processo disturbato da condizioni di stress idrico ed osmotico. Una classe ubiquitaria di chaperonine sono le heat shock proteins (HSP), tipiche della risposta a stress da elevate temperature (Vierling, 1991). Da recenti studi è emerso che alcune HSP con una simile funzione sono indotte da stress idrico ed osmotico in tabacco e patata (Zhu et al., 1993; Costa et al., 2005).

1.3.2 Geni Regolatori.

Negli ultimi anni gli sforzi dei ricercatori si sono concentrati sull'individuazione e caratterizzazione di geni regolatori dell'espressione dei geni che agiscono nella cascata di trasduzione del segnale di stress. Gli studi sono stati volti a definire in che modo il segnale di stress è percepito e quali eventi cellulari e molecolari sono indotti per la trasmissione del segnale e l'attivazione di funzioni geniche a valle (consultare review di Verslues e Zhu, 2005; Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Valliyodan e Nguyen, 2006).

Pochi dati sono a tutt'oggi disponibili riguardo all'identificazione di putativi recettori del segnale capaci di monitorare i cambiamenti dell'ambiente. Si suppone, comunque, che le piante abbiano meccanismi di percezione del segnale di stress simili a quelli di lievito, dove alcuni sensori sono stati isolati e caratterizzati (Maeda *et al.*, 1994). Ad esempio, in *Arabidopsis* è stato identificata un nuovo tipo di istidina chinasi (AtHK1) con similarità strutturali con l'osmosensore di lievito SLN1 e capace di complementare mutanti di lievito *sln1* difettivi, indicando che ATHK1 potrebbe funzionare da osmosensore anche in pianta (Urao *et al.*, 1999).

In contrasto con gli scarsi dati disponibili a proposito dei sensori primari del segnale di stress, numerosi geni sono ormai descritti come codificanti per fattori coinvolti nelle fasi successive di trasduzione del segnale di stress. Un ruolo di importanza primaria nella trasduzione del segnale di stress è svolto da una serie di chinasi e fosfatasi attraverso fosfo-defosforilazione di fattori trascrizionali (Mizoguchi *et al.*, 1997). Inoltre, nelle piante sono stati descritti sistemi di MAP-chinasi specificamente attivi in condizioni di stress osmotici (Munnik e Meijer, 2001).

Un altro evento noto nel pathway di segnalazione di carenza idrica è l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare. Questo aumento porta all'attivazione di altri effettori, come le calmoduline, proteine chinasi dipendenti da calcio (CDPK) e fosfatasi regolate da calcio (Knight *et al.*, 1997). I complessi eventi di trasduzione del segnale di stress mediati da cascate chinasi di tipo MAP o CDP sono stati recentemente descritti in dettaglio da Shinozaki *et al.* (2003).

Di estrema importanza è il ruolo di mediatore della risposta a stress svolto dall'acido abscissico (ABA), fitormone coinvolto nella regolazione dell'espressione di molti geni indotti da stress (Bray, 2002; Verslues e Zhu, 2005), di cui sono stati recentemente isolati i recettori citoplasmatici (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). E' ormai chiaro che la complessa risposta delle piante allo stress idrico coinvolge l'attivazione di almeno quattro pathway di risposta, di cui due "ABA-dipendenti" e due "ABA-indipendenti". Le quattro vie sono tra loro interconnesse e l'espressione di singoli geni a valle è regolata da una o più vie (Zhu, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003). Recentemente molti dei fattori coinvolti nei pathway di segnalazione di stress idrico e osmotico sono stati identificati e descritti in dettaglio (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Come già accennato in precedenza, i risultati di tali studi indicano chiaramente che la risposta

delle piante a stress idrico è in larga misura sovrapposta alla risposta cellulare a stress da eccesso di sali e da basse temperature (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Di seguito sono riportati i più recenti risultati sulla identificazione di geni regolatori della trasmissione intracellulare del segnale di stress idrico e sulle interconnessioni con altri tipi di stress.

Reguloni ABA-dipendenti - Il più importante pathway di segnalazione dello stress idrico ed osmotico ABA-dipendente coinvolge geni che presentano nel loro promotore la sequenza consenso ABRE (ABA Responsive Element). Tali geni sono attivati grazie all'interazione di questi elementi in cis con fattori trascrizionali ABF (ABRE Binding Factor, anche detti AREB). Tali fattori, appartenenti alla classe Basic domain leucin zipper, costitutivamente espressi, sono attivati da modificazioni post-traduzionali dipendenti da ABA (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). La loro sovra-espressione (ABF3 o AREB2) induce ipersensibilità all'ABA, aumentata traspirazione e migliore tolleranza a stress idrico (Kang *et al.*, 2002).

I fattori trascrizionali ABF sono attivati grazie ad eventi di fosforilazione dipendenti da chinasi della classe SnRK2. In assenza di stress, le chinasi SnRK2 sono mantenute in stato inattivo grazie all'interazione con e alla defosforilazione operata da fosfatasi della classe delle PP2C, quali, ad esempio, ABI1 e ABI2. In condizioni di stress idrico, si accumula ABA, che viene legato dai recettori della classe PYR/PYL/RCAR i quali, attivati, sono capaci di legare le fosfatasi della classe PP2C e liberare quindi dall'inibizione le chinasi SnRK2. Una volta libere di operare, le chinasi SnRK2 fosforilano i fattori ABF che attivano dunque la cascata di traduzione dipendente da ABA (Park *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2010; Klingler *et al.*, 2010). Un altro pathway di segnalazione ABA-dipendente coinvolge fattori trascrizionali di tipo Myb (AtMYB2) e Myc (AtMYC2), la cui sintesi dipende dall'accumulo di ABA e la cui azione è quindi più tardiva rispetto ai fattori ABF. Similmente ai fattori ABF, la loro sovra-espressione costitutiva in piante transgeniche induce ipersensibilità all'ABA e migliorata tolleranza a stress (Abe *et al.*, 2003). Geni attivati da tali fattori trascrizionali sono Rd22 ed altri geni coinvolti nello stress idrico, ABA-dipendenti, ma anche l'alcol deidrogenasi e geni regolati dall'acido jasmonico (Abe *et al.*, 2003).

Reguloni ABA-indipendenti – Il pathway di regolazione che coinvolge i fattori DREB/CBF costituisce il più importante regulone ABA-indipendente identificato in *A. thaliana*, sia per il numero di geni a valle coinvolti, sia per gli effetti della sua sovra-espressione in piante transgeniche in termini di tolleranza agli stress (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Nei promotori di diversi geni la cui espressione è indotta da carenza idrica, ma anche da temperature al di sotto di 0°C, è presente un elemento DRE/CRT (Drought Responsive Element/C Repeat) con sequenza consenso A/GCCGAC responsabile della risposta a stress ABA-indipendente

(Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994). Sono stati identificati diversi fattori trascrizionali (TF), appartenenti alla classe AP2 (Apetala2) in grado di legare elementi cis, raggruppabili nelle due classi DREB1 (DRE Binding protein 1) o CBF (C-repeat Binding Factor) e DREB2 (DRE Binding protein 2). In particolare, le proteine DREB2A e DREB2B sono coinvolte nell'espressione di geni indotti da carenza idrica (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

Recentemente sono stati isolati e caratterizzati altri tre membri della classe DREB1, la cui espressione è regolata positivamente da stress osmotico (DREB1D/CBF4) e stress salino (DREB1E/DDF1 e DREB1F/DDF2). E' stato dimostrato che l'espressione di DREB1D dipende dall'accumulo di ABA (Haake et al., 2002; Magome et al., 2004).

1.4 Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress da alte temperature.

Le risposte fisiologiche delle piante coltivate allo stress da alte temperature sono particolarmente complesse e generalmente causano una riduzione della crescita ed un calo della produttività, dovuti principalmente ad una diminuzione dell'attività fotosintetica. Le alterazioni dello sviluppo osservate a livello cellulare e fisiologico sono il risultato di modificazioni a livello molecolare dovute a variazioni dell'espressione di interi set di geni. I meccanismi fisiologici e molecolari che permettono alle piante di superare la condizione di stress e continuare ad accrescersi durante gli episodi di stress sono stati ampiamente studiati (Leone *et al.*, 2003). A livello molecolare, gli eventi che avvengono in risposta a stress termico sono - la percezione dello stress, - la trasduzione del segnale,- il raggiungimento di un nuovo equilibrio omeostatico cellulare. La cascata di trasduzione del segnale di alte temperature attiva a valle diverse categorie di geni: 1) geni codificanti heat shock protein (HSP); 2) geni che stabilizzano le membrane cellulari attraverso la modificazione della composizione dei lipidi di membrana; 3) geni che codificano per enzimi necessari per preservare l'integrità delle strutture degli organelli cellulari come geni coinvolti nel pathway ROS (Reactive Oxygen Species) e geni codificanti proteine implicate nella sintesi di molecole a ruolo protettivo come la betaina. Negli ultimi anni, i meccanismi molecolari di percezione e trasmissione del segnale di stress sono stati ampiamente studiati (Mizoguchi *et al.*, 1997; Tena *et al.*, 2001). Benché ci siano recenti lavori che riportano l'identificazione di recettori di membrana capaci di monitorare i segnali ambientali, i componenti dei sistemi di recettore/sensore non sono ancora chiari come non lo sono i meccanismi che sono attivati nelle prime fasi dopo la percezione del segnale di stress. Si suppone, comunque, che le piante abbiano meccanismi di percezione del segnale di stress simili a quelli di lievito e a cellule di mammifero, dove alcuni sensori sono stati isolati e caratterizzati (Maeda *et al.*,1994).

Maggiori informazioni sono disponibili sui diversi componenti che operano per la traduzione del segnale mediante l'attivazione di messaggeri primari e secondari (ormoni, chinasi/fosfatasi, calcio e calmoduline, etc).

Numerosi sono anche i dati di letteratura che indicano che la membrana è il sito primario di percezione dello stress e che, la composizione chimico-fisica della membrana e lo stato fisico esistente prima dello shock termico è un pre-requisito della capacità della cellula di superare lo stress e ristabilire un equilibrio metabolico.

Infatti, le cellule tendono a riorganizzare la struttura e lo stato fisico delle membrane immediatamente dopo un brusco e temporaneo cambiamento di temperatura in modo che le proprietà chimico-fisiche della membrana compensino le nuove condizioni ambientali cui le cellule sono sottoposte. Un ruolo primario in tale riorganizzazione è svolto dai cambiamenti di fluidità della membrana plasmatica che causano un'induzione della trascrizione dei geni codificanti diversi enzimi come le desaturasi. Murata e collaboratori (Susuki *et al.*, 2000) hanno dimostrato che uno stress da basse temperature induce cambiamenti nella fluidità di membrana in *Synechocystis* spp. che si traduce in un segnale in grado di attivare in modo diretto l'espressione genica a valle. Infatti, questi autori hanno identificato mediante *gene knockout* due istidin-chinasi che sembrano essere, insieme con altri geni regolatori, componenti chiave della cascata di segnali che regolano la risposta a stress da freddo (Susuki *et al.*, 2000).

Durante uno stress termico repentino la cellula non ha il tempo di riorganizzare la struttura lipidica (livello di insaturazione, cambiamenti dei gruppi polari degli acidi grassi, e altro) della membrana; quindi per stabilizzare le membrane è prodotto uno specifico gruppo di HSP che si associano in modo transiente con la membrana. Tale associazione conferisce stabilità alla membrana, e permette la conservazione di un'appropriata fluidità e permeabilità (Torok *et al.*, 1997; Vigh *et al.*, 2002). Inoltre, è stato riportato in lavori recenti che anche importanti mediatori del segnale di stress, come le chinasi MAPK, sono attivati, da stress da alte temperature attraverso la fluidificazione della membrana (Sangwan *et al.*, 2002). La cascata del segnale dopo la percezione dello stress reprime o attiva numerosi geni a valle, codificanti per proteine heat shock e altre proteine coinvolte nelle modificazioni del metabolismo cellulare in seguito a stress da alte temperature. Tra i geni attivati ci sono quelli coinvolti nella difesa e protezione dal danno delle strutture cellulari. Fanno parte del gruppo di geni immediatamente attivati quelli coinvolti nei meccanismi cellulari con ruolo protettivo, quali la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno, il controllo dell'assorbimento ionico e idrico e l'accumulo di soluti compatibili (Kovtun *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002; Leone *et al.*, 2003). Molte di queste reazioni fanno parte di sistemi di protezione normalmente attivi che sono ulteriormente indotti in risposta allo stress. Tra i meccanismi protettivi indotti durante condizioni di stress di notevole importanza è la

stabilizzazione di proteine e membrane da parte di proteine con ruolo di chaperonine tra cui le HSP (Torok *et al.*,1997). Le HSP sono capaci di limitare i danni dovuti alle alte temperature prevenendo il danneggiamento irreversibile di altre proteine e collaborando al recupero dell'omeostasi cellulare. La sintesi di proteine HSP e' dipendente, almeno in parte, dall' azione di fattori di trascrizione noti come *Heat Shock Factors* (HSF). Nel successivo paragrafo sono descritte in dettaglio struttura e funzioni di HSFs e HSPs.

1.5 Hsf e Hsp: componenti chiave nella risposta cellulare al heat stress

1.5.1 Caratteristiche strutturali e funzionali delle proteine Hsf e meccanismo di attivazione

Similmente ad altri sistemi eucariotici, le piante rispondono agli stress indotti dalle alte temperature sintetizzando elevati livelli di differenti isoforme di HSP che svolgono un ruolo centrale come 'chaperone' molecolari proteggendo le cellule dai danni cellulari provocati da *heat stress*, assicurando il corretto ripiegamento (*folding*) delle proteine, intervenendo sulla distribuzione intracellulare e nei processi degradativi delle proteine cellulari danneggiate dallo stress (Ellis, 2000; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; I fattori di trascrizione Hsf sono componenti chiave della risposta delle piante a stress termico, in quanto, in seguito a loro attivazione, si legano a elementi di regolazione presenti a monte di geni *heat stress responsive* attivandone la trascrizione (Nover and Scharf,1997; Schoffl *et al.*,1998). Ad esempio, il gene codificante per l'enzima APX1, necessario alla detossificazione dei ROS che si accumulano in risposta a stress termico, presenta nel proprio promotore un sito di legame per i fattori HSF, che sono dunque responsabili dell' attivazione dipendente da caldo della trascrizione di APX1 (Miller R. *et al.*, 1992;). Altri geni attivati da fattori Hsf includono le HSP, responsabili della protezione delle proteine cellulari dalla denaturazione causata da stress da caldo e essenziali quindi per il mantenimento dell' omeostasi proteica (Scharf KD. *et al.*, 2012). Il ruolo chiave che i geni *HSF* svolgono nella termotolleranza è stato evidenziato da studi di silenziamento genico in diverse specie vegetali. Piante di pomodoro in cui il gene HsfA1a è stato silenziato hanno un fenotipo simile a piante controllo non trasformate, ma una minore resistenza alle alte temperature, (Mishra S.K. *et al.*, 2001).

In *Arabidopsis*, il silenziamento di geni del gruppo HsfA1 ha causato una minore termotolleranza rispetto a piante controllo (Mishra S.K. *et al.*, 2002;), mentre una espressione coordinata dei geni HsfA1 ed HsfA2 conferisce una resistenza superiore a quella data dai due geni singolarmente (Chan-Schaminet K.Y. *et al.*, 2009).

La funzione essenziale dei fattori di trascrizione Hsf ha determinato un'espansione di questa famiglia genica, probabilmente generata da fenomeni di duplicazione genica e genomica, per garantire, da un lato, una parziale ridondanza, e d'altro canto, una diversificazione della struttura e della funzione dei diversi Hsf per la regolazione fine della risposta cellulare a stress di durata e intensità variabile (Proost S. *et al.*, 2011).

Malgrado la grande variabilità nella sequenza, la struttura di base e gli elementi di regolazione riconosciuti nella regione promotore dei geni heat stress responsive, sono altamente conservati tra i diversi Hsf (Baniwal S.K. *et al.*, 2004;., 2010; Scharf KD. *et al.*, 2012).

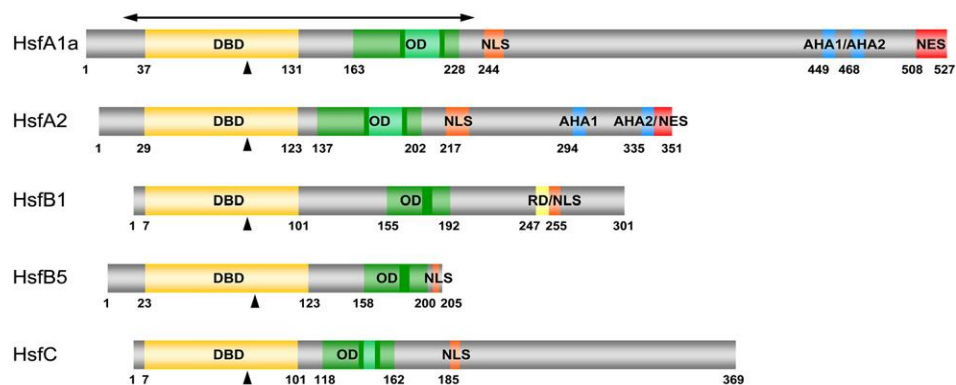


Figura 1. Rappresentazione della organizzazione strutturale dei domini di 5 fattori di trascrizione della classe Hsf di pomodoro (Scharf KD. *et al.*, 2011).

La struttura di base degli Hsf è piuttosto articolata e presenta:

- un dominio di legame al DNA (DBD) localizzato nella porzione N-terminale, formato da un fascio di tripla-elica e quattro filamenti antiparalleli β -foglietto (Schultheiss J., *et al.*, 1996;). La porzione idrofobica del dominio ne assicura la precisa e selettiva interazione dei motivi elica-giro-elica (H2-T-H3) con gli elementi promotori heat stress (HSE) (; Sakurai H. and Enoki Y., 2010) formati da una sequenza palindromica (5'-AGAAnnTTCT-3') a monte del *TATA box* (Nover L. *et al.*, 2001;); un dominio di oligomerizzazione (OD) connesso al DBD attraverso un filamento di lunghezza variabile (15-80 amminoacidi). È costituito da dominio coiled-coil di proteine leucine type-zipper. Sulla base di questo dominio si distinguono 3 classi di Hsf nelle piante, che sono la classe A, B e C (Nover L. *et al.*, 2001;)

- segnale di localizzazione nucleare (NLS) localizzato a valle del OD, costituito da gruppi di amminoacidi basici (Lyck R. *et al.*, 1997)
- segnale di esportazione nucleare (NES), costituito da sequenze ricche di leucina che si collocano alla porzione C-terminale di diversi Hsf (Heerklotz D. *et al.*, 2001). Costituisce uno specifico segnale che regola la dinamica distribuzione di Hsf nel nucleo e nel citoplasma (Heerklotz D. *et al.*, 2001).
- motivi di attivazione (motivi AHA) della trascrizione presenti negli Hsf di classe A, localizzati nel dominio C-terminale, caratterizzati da amminoacidi aromatici (W,F,Y), idrofobici (L, I, V) ed acidi (E, D) (Kotak S., *et al.*, 2004;.).

In *Arabidopsis thaliana* è presente un set di 21 HSF con 15 membri appartenenti alla classe A, 5 membri della classe B, ed 1 della classe C (Scharf KD. *et al.*, 2012).

Il numero di geni HSF presenti in *A. thaliana* la colloca tra il gruppo di piante che ne possiedono in minor numero, insieme al *Ricino*, la *Vite*, il *Citrus* e la *Carica* con circa 18-19 geni HSF. Nella maggior parte delle piante il numero di questi fattori aumenta fino a raggiungere un massimo di 52 HSF in soia (Scharf KD. *et al.*, 2012).

Alcuni geni Hsf sono costitutivamente espressi mentre altri vengono indotti da stress.

In pomodoro, specie anch'essa recentemente sequenziata (*The tomato genome consortium*, 2012) e di cui sono disponibili ampie collezioni di EST, ricerche per omologia di sequenza hanno permesso di identificare circa 18 Hsf (Baniwal *et al.*, 2004). Il gene HsfA2 di pomodoro, oggetto della presente tesi, codifica per un HSF di classe A. Di questo gene sono state identificate due isoforme in riso, mentre in pomodoro ed *Arabidopsis* è presente una sola copia (Baniwal *et al.*, 2004). La sintesi di HsfA2 viene indotta dalle elevate temperature ed in pomodoro è integrata in un *network* di interazioni con altre proteine come HsfA1 (*Heat Shock Factor* master regolatore della risposta indotta da *heat stress* in pomodoro) e Hps di basso peso molecolare come Hsp 17.4 CII e Hsp 17-CI che ne influenzano la solubilità, la localizzazione intracellulare e la funzione di attivatore (Heerklotz *et al.*, 2001). L'espressione del gene e i meccanismi di azione di HsfA2 sono, pertanto, ben noti in pomodoro dove è stato osservato che la sua attivazione avviene grazie a HsfA1 e che, nelle prime fasi della risposta agli stress termici, questo fattore di trascrizione, grazie alla presenza del dominio di oligomerizzazione si associa ad HsfA2 ed esplica il suo ruolo di co-attivatore trascrizionale, inducendo l'espressione di geni coinvolti nella risposta *heat stress* (Port *et al.*, 2004). Successivamente, con l'aumentare della sua concentrazione, una parte della proteina viene trasferita dal nucleo al citoplasma, dove avviene l'interazione con Hsp 17.4 CII e Hsp 17 CI, che hanno tuttavia ruoli diversi nel processo. Hsp 17.4 CII agisce, infatti, come un co-repressore e favorisce l'accumulo di HsfA2 all'interno del citoplasma sotto forma di

complessi insolubili detti HGS (*large cytoplasmic multichaperones complexes*), contenenti anche proteine denaturate. Le Hsp 17 di classe I sono, invece, necessarie per la risolubilizzazione dei complessi HGS e dunque di HsfA2, processo che è stato osservato all'interno della cellula, soprattutto durante recupero dallo stress termico o in condizioni di temperature controllo. In sistemi cellulari termotolleranti di pomodoro si ipotizza che HsfA2 sia stabilizzato in una forma inattiva all'interno del citoplasma mediante l'interazione con Hsp 17.4 CII ed in presenza di Hsp 17 CI e che venga, così, conservato per essere rapidamente attivato non appena le cellule sono esposte alle alte temperature. La presenza di questo meccanismo potrebbe essere associata con una migliore capacità dei sistemi termotolleranti di affrontare rapidamente lo stress indotto da alte temperature e di attivare prontamente tutti quei geni coinvolti nelle risposte necessarie per evitare e/o riparare velocemente i danni arrecati alle condizioni di stress. Un recente studio condotto da Giorno e colleghi (2010) ha dimostrato che l'espressione di HsfA2 e HSP17.4 CII è altamente regolata in risposta a stress da caldo in antere di pomodoro, uno degli organi maggiormente suscettibili a condizioni di stress da alte temperature, che determinano una riduzione della vitalità e germinabilità del polline. Sia in condizioni di stress severo che lieve, infatti, HsfA2 viene indotto in microspore di pomodoro e i suoi livelli di trascritto e di proteina si mantengono elevati anche nel successivo stadio di *recovery*, indicando che HsfA2 potrebbe essere un componente essenziale nella risposta a stress termico anche in antere e polline di pomodoro (Giorno *et al.*, 2010).

1.5.2 Heat shock proteins (HSPs)

Lo stress termico induce la sintesi della famiglia di proteine *heat shock* (proteine da shock termico, HSP), appartenenti alla famiglia degli chaperones molecolari.

Alcune HSP, nei vegetali come in altri organismi, si accumulano velocemente in risposta a diversi segnali di stress, termico in particolare, al fine di prevenire e/o limitare danni conformazionali a proteine cellulari durante episodi di stress (Volume publication date November 1993 C Georgopoulos, and W J Welch). Le HSP sono classificate, in base alla loro omologia di sequenza e in base al loro peso molecolare, in proteine ad alto peso molecolare: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e in '*small Heat Shock Proteins*' (sHSP), cioè HSP a basso peso molecolare (Becker J. & Craig E.A., 1994).

Le proteine HSP60, anche chiamate chaperonine, svolgono un ruolo molto importante, intervenendo nella sintesi e traslocazione di nuove proteine (Bukau *et al.*, A.L., 1998;). Ad esempio, la Rubisco, enzima chiave coinvolto nella fissazione dell'anidride carbonica, è assistita nel raggiungimento della propria conformazione attiva da HSP60 (Apuya N.R. *et al.*, 2001). Le HSP70 sono invece proteine presenti in quasi tutti i compartimenti cellulari e, con l'aiuto di

proteine che fungono da co-chaperones, partecipano al ripiegamento di proteine denaturate sia in condizioni di stress che in condizioni controllo. La funzione principale che le HSP70 svolgono sembra quella di prevenire l'aggregazione di proteine denaturate da stress termici. Le HSP70 sono inoltre coinvolte nei meccanismi di trasporto sia intracellulare che extracellulare di proteine, e facilitano i tagli proteolici di proteine denaturate all'interno degli organelli destinati alla degradazione, quali lisosomi e proteasomi (Hartl F.U.,1996).

Una delle HSP ad alto peso molecolare meglio studiate è HSP90, uno chaperone molecolare altamente conservato, responsabile della stabilità di un elevato numero di proteine (Van Ooijen Pearl and Prodromus, 2006) ed importanti per il raggiungimento della termotolleranza (Rutherford S.L. & Lindquist S., 1998; Queitsch C. *et al.*,2002).

Le HSP90, attraverso la formazione di un complesso proteico HSP70/HSP90, ricoprono inoltre un ruolo importante nei meccanismi di regolazione a feed-back negativo (Hahn A. *et al.*, 2011;). In condizioni controllo, il complesso proteico HSP70/HSP90 lega i fattori di risposta allo stress HsfA1, inibendone l'attività, e HsfB1, promuovendone la degradazione (Yamada K. & Nishimura M., 2008). In condizioni di stress, invece, le proteine HSP70/90 rilasciano i fattori Hsf, a questo punto liberi di attivare l'espressione di geni indotti dal calore (Hahn A. *et al.*, 2011; Nishizawa-Yokoi A. *et al.*, 2010; Yamada K. & Nishimura M., 2008).

Durante la fase di attenuazione, la trascrizione di geni HS diminuisce in seguito all'interazione di HsfA1-Hsp70, seguita dalla disattivazione e degradazione del fattore HsfB1, che si lega inoltre anche a fattori di trascrizione costitutivi, ristabilendo l'espressione genica delle condizioni controllo.

Le HSP100 svolgono funzioni di prevenzione della formazione di proteine denaturate e di aggregati proteici. Inoltre, le HSP100 sono coinvolte nella risolubilizzazione gli aggregati i quali, in seguito al legame con HSP100, sono rilasciati in una conformazione che permette loro di legarsi ad altri chaperones favorendone il corretto ripiegamento (Glover J.R. & Lindquist S., 1998; Goloubinoff P. *et al.*, 1999).

1.5.3 Le *small heat shock proteins* (sHSP)

Le sHSP sono la classe di proteine HS che si accumula in maggiore quantità in pianta in risposta a stress da caldo (Plesofsky-Vig N. *et al.*, 1992; Waters E.R.& Vierling E., 1999a;Kriehuber T.-*et al.*, 2010; Poulain P. *et al.*, 2010). Le sHSP costituiscono un gruppo di proteine accomunate dal basso peso molecolare, compreso tra i 12 e i 43 KDa, dall' assenza di domini di legame all' ATP e da un'elevata affinità per proteine denaturate, che vengono legate mediante l'esposizione delle superfici idrofobiche (Nakamoto H. & Vigh L., 2007;Haslbeck M. *et al.*, 2005; McHaourab H. S. *et al.*, 2009;. Eyles S.J. &Gierasch L.M., 2010; Tyedmers J. *et al.*,

2010). Altra caratteristica delle sHSP vegetali è la capacità di formare aggregati di alto peso molecolare, definiti “granuli HS”, durante la risposta allo stress da caldo. Tali granuli sembra si formino dall’aggregazione di proteine denaturate con le sHSPs (Nover L., 1991). A seconda della localizzazione intra-cellulare, le sHSP sono classificate in diverse classi: citosoliche (classe I e II), cloroplastiche (III), mitocondriali (IV), associate al reticolo endoplasmatico (V) o legate alla membrana cellulare (VI). Le small HSP sono espresse durante le differenti fasi del ciclo cellulare, o stadi di crescita e sviluppo, e sono specificamente indotte da heat stress. Il loro ruolo nella risposta alle alte temperature sembra correlato alla loro capacità di funzionare come delle chaperonine molecolari (Forreiter *et al.*, 1997;), ossia riconoscono le proteine che si stanno denaturando e le riportano nella conformazione nativa o assistono il folding delle proteine neo-sintetizzate in modo da prevenire la formazione di aggregati molecolari intracellulari (Lee *et al.*, 1995). Inoltre, le sHSP localizzate nei mitocondri o nei cloroplasti hanno un ruolo protettivo nei confronti della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri (Malik *et al.*, 1999) e nel fotosistema II (Heckathorn *et al.*, 1998) rendendo tali elementi più stabili durante lo stress da alte temperature. Per quanto riguarda poi il ruolo nella tolleranza alle alte temperature dei geni sopra elencati, negli ultimi quindici anni numerosi sono gli esempi di piante transgeniche modello in cui la sovraespressione di un singolo gene, delle categorie descritte, induce livelli parziali di tolleranza. Per una tolleranza più generalizzata, essendo il carattere complesso e poligenico, è necessario che le piante attivino contemporaneamente differenti meccanismi di risposta allo stress.

Le sHSPs hanno sequenza variabile, ma sono caratterizzate da una porzione conservata di 90 residui amminoacidici che formano un dominio α -cristallino (ACD) (Caspers G. J. *et al.*, 1995) presente all’estremità C-terminale. Al dominio N-terminale sono invece presenti sequenze segnale, necessarie per la corretta compartimentalizzazione intracellulare delle diverse sHSP (Waters E.R., 2012).

Il dominio ACD sembra essere il *core* di aggregazione degli oligomeri, di dimensioni comprese tra 150-800 kDa, che si formano in seguito all’aggregazione di diverse sHSP. Tali oligomeri sono composti da 9-32 subunità che formano una reversibile e dinamica struttura quaternaria (Lee G. J. *et al.*, 1995;).

La regione N-terminale, che precede l’ACD, di lunghezza e struttura variabile, svolge un duplice ruolo sia strutturale che funzionale nella risposta HS (Yeh C. H. *et al.*, 1997).

Le sHSPs permettono alle piante di rispondere ad una vasta gamma di stress abiotici quali variazioni della temperatura, siccità, alto irraggiamento solare, raggi UV, stress osmotico, stress ossidativo (Sarkar K.N. *et al.*, 2009; Gorovits R *et al.*, 2007; Sun W. *Et al.*, 2002) e la loro

concentrazione può arrivare sino all'1% delle proteine totali in condizione di stress da calore (Sarkar K.N. et al., 2009; Hsieh M.H. et al., 1992; Heckathorn S.A. et al., 1998; Sanmiya K. et al., 2004). Studi scientifici hanno dimostrato che queste proteine, di per sé incapaci di rinaturare proteine denaturate, formano con queste dei complessi al fine di prevenirne l' aggregazione; i complessi diventano poi il bersaglio di HSP100/70 e altri co-chaperones ATP-dipendenti che presiedono alla rinaturazione (fig. 2) (Neelam K Sarkar N.K *et al.*, 2009; Cashikar AG *et al.*, 2005; Lee GJ and Vierling E, 2000). In aggiunta, si pensa che le HSP20 favoriscano, attraverso il legame con esse, anche la successiva degradazione di proteine denaturate il cui refolding non è più possibile (Kotak *et al.*, 2007; Liberek *et al.*, 2008).

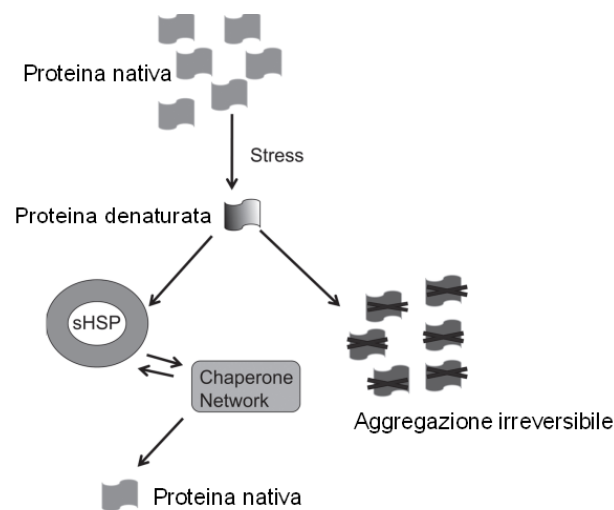


Figura 2. Schema del ruolo che le sHSP svolgono in condizioni di stress (Waters ER., 2012).

1.6 Il pomodoro: una specie di grande importanza economica

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*), specie originaria del continente americano, è una delle più importanti specie vegetali coltivate al mondo. I principali paesi produttori sono Cina, USA, Turchia, India, Italia, Egitto, Spagna, Brasile, Messico e Russia. L'Italia è sempre stata uno dei maggiori produttori mondiali di derivati del pomodoro, che riveste, quindi, un posto rilevante nell'economia agricola della nostra Nazione e in particolare per l'agricoltura meridionale dove si concentra la maggior parte della produzione.

Dalla tabella 1. si evince che la superficie mondiale coltivata a pomodoro è stata di poco superiore ai 5 milioni di ettari e il continente asiatico con oltre il 56% ha la quota maggiore, segue il continente africano con circa il 23% e al terzo posto troviamo l'Europa con i suoi 574 mila ettari.

Tabella 1.1: Produzione mondiale e superficie coltivata a pomodoro nell'anno 2008

Continente	Superficie (Ha)	% superficie	Produzione (ton)	% produzione
Africa	1.180.943	22.59	12.482.054	9.63
America	509.320	9.74	24.853.939	19.17
Asia	2.954.418	56.51	71.498.620	55.15
Europe	574.512	10.99	20.403.445	15.74
Oceania	8.690	0.17	411.825	0.32
Mondo	5.227.883		129.649.883	

Fonte: nostre elaborazioni dati FAOSTAT 2008

Il fabbisogno idrico in campo di pomodoro è piuttosto elevato, essendo di circa 400-600 mm di acqua entro un periodo di 75-125 giorni dall'inizio dell'allegagione ed i metodi di irrigazione a goccia sono ampiamente utilizzati nella loro produzione (Zegbe *et al.*, 2003). Il pomodoro può tollerare la siccità in una certa misura (André *et al.*, 1992; Baradas, 1994; Hanson *et al.*, 2004), sebbene sia particolarmente sensibile a fenomeni di stress idrico durante la fioritura. La fase di fioritura e allegagione del pomodoro sono inoltre particolarmente suscettibili a stress da elevate temperature, tra l'altro molto frequenti in campo. In generale, solo poche ore di trattamento ad elevate temperature (sopra i 40°C), allo stadio critico della gametogenesi, possono influenzare in maniera irreparabile la vitalità degli ovuli, la deiscenza e il trasferimento del polline (Rudich *et al.*, 1977) e quindi la produzione. Si stima che dal 30% al 100% del prodotto commerciabile di pomodoro è perso a causa di repentini ed imprevedibili cambiamenti di temperatura poiché alte temperature notturne (maggiori dei 26°C) o diurne (maggiori di 40°C) e basse temperature notturne (più basse dei 10°C), sono la più frequente causa di danno alla gametogenesi e alla fecondazione in campo.

L'uso di varietà resistenti ridurrebbe dunque l'impatto negativo di stress ambientali sulle produzioni di pomodoro, determinando notevoli vantaggi economici ed ecologici, legati ad un possibile minor fabbisogno idrico.

Il miglioramento genetico del pomodoro trae vantaggi dalla disponibilità di risorse genetiche e genomiche che possono rappresentare validi strumenti genetici per lo studio dei caratteri di interesse. Tra queste le Linee di Introgressione (*Introgression Line IL*), in cui singoli segmenti di cromosoma di una specie selvatica affine sono inseriti in condizione di omozigosi nel contesto genomico della specie coltivata (Eshed *et al.*, 1994), offrono la possibilità di dissezionare la variabilità genetica associata a caratteri complessi come quelli che controllano la qualità nutrizionale del frutto e la tolleranza alla siccità. La prima popolazione di linee di introgressione di pomodoro è stata costituita attraverso incroci tra la specie selvatica *S. pennellii* (LA0716) e la cultivar M82 della specie coltivata *S. lycopersicum*. La cultivar M82 è una pianta a sviluppo determinato con taglia media e frutti regolari.

La specie *S. pennellii* è una specie a frutto verde comunemente usata come materiale per studi genetici in pomodoro. L'accessione LA0716 è stata raccolta nel deserto Peruviano, è una specie autocompatibile, altamente *inbred* e può essere facilmente incrociata con *S. lycopersicum* (Rick *et al.*, 1981)

La prima generazione di IL consiste di 50 linee di introgressione ognuna portante una singola introgressione della specie *S. pennellii*. Una seconda generazione ha consentito di espandere la popolazione a 76 linee (le 50 linee originali più 26 sub-linee).

Ognuna di essa contiene una singola introgressione proveniente dall'accessione LA0716 di *S. pennellii* nel background genetico della cv M82 di *S. lycopersicum* (http://solgenomics.net/maps/pennellii_il/index.pl). Queste linee sono particolarmente utili per il mappaggio di QTL (Quantitative Trait Loci) di interesse su specifici cromosomi (Lippman *et al.*, 2007). In particolare, la popolazione di 50 linee di introgressione di *S. pennellii* è stata utilizzata anche in lavori condotti per l'identificazione dei QTL per l'acido ascorbico, fenoli totali e carotenoidi in pomodoro (Rousseaux *et al.*, 2005; Di Matteo *et al.*, 2010).

1.6.1 La genomica del pomodoro

Le nuove risorse genomiche e le tecnologie di ultima generazione per il sequenziamento e l'analisi del genoma e della sua espressione stanno contribuendo sotto molti aspetti alla dissezione molecolare dei caratteri quantitativi. Il genoma di pomodoro è stato sequenziato e una prima versione è stata resa pubblica nel 2010 dal Consorzio Internazionale coinvolto nel International Solanaceae Genome Project (SOL) (<http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae->

project). Contemporaneamente, sono state rese disponibili nuove tecnologie per lo studio del trascrittoma. Tra queste, differenti array sono attualmente disponibili per le analisi di trascrittoma del pomodoro (Alba *et al.*, 2004; Alba *et al.*, 2005), tra cui il TomatArray1.0 basato sulla tecnologia Combimatrix, disegnato sui Tentative Consensus del TIGR *Lycopersicon esculentum* Gene Index (Release 11.0, 21 Giugno 2006).

Tra le nuove potenzialità offerte dagli studi di genomica in pomodoro, una delle strategie più potenti per l'identificazione dei meccanismi di regolazione genetica in fenotipi di interesse è la —trascrittoma comparativa, che permette di identificare i profili di espressione di un gran numero di geni su linee e/o trattamenti a confronto.

Sviluppo di piattaforme per l'analisi trascrittoma, proteomica, metabolomica. L'ampiezza e la completezza delle collezioni EST disponibili per il pomodoro ha permesso già dal 2000 di realizzare diversi strumenti per analisi del trascrittoma, costruiti utilizzando prodotti di PCR amplificati come EST o frammenti di geni candidati di cui si desidera monitorare il livello d'espressione (microarray a cDNA) oppure impiegando oligonucleotidi (oligo-array) sintetizzati direttamente sui chip. Sono oggi quindi disponibili per la comunità scientifica diversi tipi di piattaforme per l'analisi trascrittoma aggiornate con i più recenti dati di sequenza alle quali si stanno aggiungendo quelle che utilizzano tecnologie ad altissima produttività basate su approcci di sequenziamento di nuova generazione (RNAseq). Tutti gli approcci di analisi di espressione prevedono l'uso di strumenti bioinformatici e statistici molto avanzati e il concomitante sviluppo di banche dati di espressione genica dedicate al confronto dei dati di diversi esperimenti e all'integrazione di dati di piattaforme differenti al fine di associare il livello di espressione di geni e network in una determinata situazione sperimentale/stadio di sviluppo/ tessuto a un fenotipo d'interesse e quindi di individuare geni coinvolti nel controllo dei caratteri oggetto di studio. Negli ultimi anni approcci di analisi globale del trascrittoma di pomodoro hanno quindi permesso di identificare geni chiave coinvolti nello sviluppo e maturazione del frutto e nella determinazione della sua qualità organolettica e nutrizionale nonché geni coinvolti nella risposta a stimoli biotici e abiotici ed, in particolare, set genici la cui espressione è putativamente correlata con la capacità di tollerare alte temperature. Nel 2009, Frank e colleghi hanno condotto una analisi trascrittoma su microspore di pomodoro sottoposte a stress termico, dimostrando il coinvolgimento nella risposta a stress termici di sistemi di *scavenging* dei ROS, di variazioni nei profili ormonali e dell'accumulo di zuccheri (Frank *et al.*, 2009). In uno studio successivo, Bitar *et al* (2011) hanno condotto una analisi comparativa dell'espressione genica in microspore di genotipi tolleranti e sensibili di pomodoro. Dai risultati di queste analisi si evince che, sebbene in entrambi i genotipi si abbia un aumento della trascrizione di fattori collegati alla termotolleranza, quali Hsfs e HSPs, nel genotipo tollerante si ha una maggiore espressione basale di questi

trascritti, indicando che genotipi tolleranti potrebbero essere meglio preparati a rispondere a questo tipo di stress. Da questo studio si evince inoltre che il genotipo tollerante attiva cambiamenti di espressione genica in maniera più “mirata” rispetto al genotipo sensibile, attivando un numero inferiore di classi funzionali diverse (Bita *et al.*, 2011).

Associati agli studi di tipo genomico, grazie allo sviluppo di protocolli sperimentali e approcci bioinformatici ad alta produttività, recentemente anche in pomodoro si sono affermati studi globali sulla componente proteica e metabolica. Anche se specifiche criticità ancora esistono sia dal punto di vista tecnico-procedurale che di integrazione delle diverse piattaforme, l’interesse dell’applicazione integrata delle tecnologie -omiche in pomodoro è al momento focalizzata sulla maturazione del frutto. In tale sistema l’analisi dei geni espressi è correlata al corredo proteomico del frutto in maturazione e al profilo dei principali metaboliti e della componente volatile, fattore cruciale dell’aroma globale del frutto. Tali approcci hanno già messo in evidenza fondamentali differenze molecolari tra i diversi tipi di pomodoro che caratterizzano le produzioni agricole italiane (tipo Allungato, Vesuviano, Sorrento, Corbarino) che spiegano le loro peculiari e distintive caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Dal punto di vista applicativo le conoscenze acquisite permetteranno lo sviluppo di strumenti di grande efficacia non solo per la selezione di nuovi tipi con caratteristiche del frutto migliorate ma anche per la salvaguardia della tipicità dei prodotti locali, la tracciabilità dei prodotti sia freschi che trasformati e la sicurezza alimentare.

Tabella 1.2 Risorse disponibili per l’analisi genetica e genomica del pomodoro.

Sito	Indirizzo web	Caratteristiche
Solanaceae Genomics Network (SGN)	www.sgn.cornell.edu	Database di informazioni genomiche, genetiche e tassonomiche su specie delle Solanaceae e delle Rubiaceae
TIGR Plant Gene Indexes	compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html	Cataloghi di sequenze EST e geni di pomodoro e dati sui loro profili d’espressione, ruoli cellulari, funzioni e relazioni evolutivistiche
Plant Genome Database (PlantGDB)	www.plantgdb.org/	Risorsa per la genomica comparativa di specie vegetali. Comprende banche EST specie-specifiche di pianta, fornisce strumenti accessibili per l’analisi e l’annotazione di genomi vegetali
Tomato Genetics Resource Center (TGRC)	tgrc.ucdavis.edu/	Banca di germoplasma di specie selvatiche, mutanti monogenici e varie collezioni di

Genes that make tomatoes	zamir.sgn.cornell.edu/mutants	genotipi di pomodoro Database di mutanti di pomodoro, comprendente anche un'ampia popolazione mutagenizzata per via chimica o fisica
EU-SOL	www.eu-sol.net/	Progetto europeo per lo sviluppo di varietà di pomodoro e patata di alta qualità
Computer aided bioscience (CAB group)	biosrv.cab.unina.it	Collezioni EST di pomodoro, patata e altre Solanaceae , portale ISOL,
Metapontum Agrobios	www.agrobios.it/ricerca/genomfunz.htm	Piattaforma di genomica funzionale attraverso TILLING
Tomato Expression Database	ted.bti.cornell.edu/	Catalogo delle piattaforme microarray e dei dati di espressione disponibili in pomodoro
Center for Gene Expression Profiling, Cornell University	bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html	Piattaforme microarray TOM1 TOM2

1.7 Scopo e Contenuto della tesi

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle più importanti specie vegetali coltivate al mondo. La crescita, lo sviluppo e la produttività del pomodoro sono fortemente influenzati dagli stress abiotici come ad esempio ridotta disponibilità d'acqua ed elevate temperature. Lo sviluppo di varietà di pomodoro in grado di garantire buone rese produttive e ottime caratteristiche qualitative dei frutti anche in condizioni ambientali non ottimali è uno degli obiettivi del miglioramento genetico di questa specie per lo sviluppo di sistemi produttivi realmente sostenibili per l'ambiente in termini di risparmio di risorse naturali e in grado di soddisfare le richieste dei mercati globali.

La presente tesi si inserisce nelle attività di ricerca dell'Istituto di Genetica Vegetale (CNR-IGV, Sezione di Portici) volte alla comprensione della complessità degli eventi molecolari di risposta agli stress abiotici (idrici e termici) e all'identificazione dei principali determinanti genici che influenzano la produttività e la stabilità delle produzioni agricole in condizioni ambientali avverse. In tale ambito, gli scopi del presente lavoro di tesi sono stati:

- A. La caratterizzazione della risposta fisiologica, biochimica e molecolare di diversi genotipi di pomodoro tolleranti/suscettibili a condizioni di ridotto apporto idrico;
- B. L'analisi funzionale di alcuni geni di pomodoro noti per essere coinvolti nella risposta/tolleranza alle alte temperature.

Il conseguimento del primo obiettivo, è stato raggiunto mediante un approccio multidisciplinare. In particolare le attività svolte hanno riguardato:

- *La caratterizzazione di diversi genotipi di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico.* Differenti genotipi di pomodoro sono stati allevati in vasche in condizioni semi-controllate con due differenti volumi di adacquamento in collaborazione con i ricercatori dell'Università degli studi di Bari Aldo Moro. Diversi parametri bio-agronomici sono stati valutati e utilizzati per la determinazione di indici di tolleranza e di danno allo stress idrico. Tale analisi ha consentito la caratterizzazione di differenti genotipi di pomodoro e di selezionare alcuni di essi con differenti gradi di tolleranza/suscettibilità al deficit idrico per successivi e ulteriori studi.
- *La messa a punto delle condizioni sperimentali di allevamento di diversi genotipi di pomodori sia in vaso che fuori suolo.*

A tale scopo è stato adottato un sistema sperimentale di allevamento in vaso di diversi genotipi di pomodoro caratterizzati da differenti indici di tolleranza a stress idrico. Tale protocollo di allevamento ha previsto l'interruzione dell'irrigazione, seguito da un periodo di *recovery* con normale irrigazione e un secondo periodo di deficit idrico. Un secondo sistema sperimentale è stato messo a punto con l'allevamento di giovani piante di due genotipi di pomodoro in coltura idroponica in cui lo stress idrico è stato imposto mediante addizione graduale di PEG 8000 nel mezzo di coltura per 24-72 h. I sistemi sperimentali adottati hanno permesso un'accurata fenotipizzazione dei genotipi e l'integrazione di parametri fisiologici, biochimici e molecolari caratterizzanti la risposta alle condizioni di carenza idrica imposte.

- *La caratterizzazione della risposta fisiologica in condizioni di carenza idrica.*

In entrambi i sistemi sperimentali, è stata quindi caratterizzata la risposta fisiologica di alcuni genotipi di pomodoro confrontandola con quella di piante allevate in condizioni controllo, in collaborazione con i ricercatori del CNR-ISAFOM. Le analisi fisiologiche hanno previsto la determinazione di importanti parametri fisiologici come la conduttanza stomatica, il tasso d'attività fotosintetica, la resa massima del fotosistema PSII e il potenziale idrico nonché la valutazione di indici biometrici come il peso secco di vari tessuti/organi e l'area fogliare. La risposta fisiologica è stata correlata alla complessa risposta biochimica e molecolare di risposta al deficit idrico.

- *Lo studio dei cambiamenti dei profili di espressione di geni putativamente coinvolti nei meccanismi di risposta/ tolleranza alla carenza idrica.*

A tale scopo è stato selezionato un set di geni, mediante ricerca bibliografica e bioinformatica, tra quelli noti per il loro coinvolgimento nei meccanismi di risposta a stress osmotici e idrici e codificanti 1) per enzimi coinvolti in importanti vie metaboliche per la biosintesi di ormoni e di osmoprotettori (*p5Cs*, *nced* e *aco*); 2) per fattori trascrizionali importanti per la modulazione della risposta molecolare (*erd15*); 3) per enzimi implicati nella percezione e trasduzione del segnale (*mpk1* e *phosp*), 4) per proteine di protezione delle strutture cellulari durante la disidratazione cellulare (*lea*).

Dall'analisi dei profili di espressione ottenuti mediante quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) risulta chiaro che l'intensità e la durata delle condizioni di stress idrico influenzano l'espressione dei geni selezionati in una maniera genotipo-specifica e tessuto-specifica. Alcuni geni sono rapidamente attivati in risposta a bassi potenziali idrici mentre l'espressione di altri è legata a meccanismi adattativi di risposta. I risultati evidenziano inoltre che il metabolismo degli ormoni ABA e Etilene sono fortemente regolati in condizioni di stress idrico imposte sia in foglia che in

radice. Tali condizioni inducono inoltre alterazione dell'espressione del gene *p5cs*, enzima chiave della biosintesi della prolina.

- *La valutazione di parametri biochimici in foglie e radici di pomodoro correlati alla risposta a stress idrico.*

Sono stati determinati, i livelli di accumulo di prolina libera e il contenuto in foglie e radici di acido abscissico. In seguito alle drastiche variazioni dei parametri fisiologici e la modulazione del network genico, sono state evidenziate drastiche alterazioni dei parametri biochimici analizzati correlati alla variazione d'espressione di geni che codificano importanti regolatori dei pathway biosintetici della loro sintesi.

Tale approccio integrato ha consentito inoltre di identificare alcune fasi sperimentali di maggior interesse per uno studio globale della regolazione dei network genici coinvolti durante stress idrici di elevata intensità, nella fase di recupero e durante un secondo ciclo di stress. I campioni di RNA della cv M82 delle fasi citate sono stati quindi preparati ai fini di un sequenziamento massivo del trascrittoma di pomodoro mediante la tecnologia RNAseq, i cui risultati saranno a breve disponibili.

Un secondo obiettivo specifico del progetto di tesi è stato lo studio funzionale in pomodoro dei geni candidati coinvolti nella risposta allo stress da alte temperature (HS) durante lo sviluppo del fiore e l'allegagione del frutto, precedentemente identificati mediante analisi trascrittomiche di bocci fiorali. In tale ambito sono state svolte le seguenti attività:

- *L'ottenimento di piante transgeniche sovraesprimenti geni coinvolti nella risposta/tolleranza allo stress termico.*

A tal scopo è stato utilizzato un approccio di *gain of function* che ha previsto la selezione di 7 geni di diverse categorie funzionali, la costruzione di vettori per la loro sovraespressione sia sotto un promotore costitutivo sia sotto un promotore inducibile da alte temperature e lo sviluppo di numerose linee transgeniche di pomodoro (cv M82) per ciascuno dei geni oggetto di studio. Tale materiale transgenico sarà utilizzato per la definizione del ruolo biologico dei geni selezionati.

- *La caratterizzazione molecolare e fisiologica di piante sovraesprimenti i geni *hsp7.6* e *hsfA2*.*

E' stato studiato il ruolo funzionale dei geni *hsfA2* e *hsp17.6* nella risposta ad alte temperature (HS) mediante studio dell'espressione genica ed analisi di vitalità e germinazione *in vitro* del polline.

La parziale caratterizzazione fisiologica e molecolare di alcune linee, codificanti una *heat shock protein* (Hsp17.6) e un fattore trascrizionale (HsfA2), ha evidenziato che le condizioni croniche di HS utilizzate inducono un forte calo della vitalità e germinabilità del polline confermando che le antere sono un sito di danno particolarmente sensibile allo stress imposto. Le analisi della funzionalità del polline non hanno comunque evidenziato un effetto significativo della sovraespressione dei due geni introgressi. L'analisi di espressione qRT-PCR ha evidenziato che la sovraespressione dei transgeni induce, sia in foglie che in antere, una rimodulazione costitutiva dell'espressione di alcuni membri del network molecolare di risposta, restando tuttora da definire il ruolo di specifiche classi di HSP nella risposta alle condizioni di HS cronico utilizzate.

Nel complesso i risultati ottenuti hanno consentito una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari di risposta allo stress idrico e termico utile per individuare strategie innovative per migliorare la sostenibilità della produzione pomodoro durante le condizioni tipiche di allevamento caratterizzate da elevate temperature croniche e numerosi interventi irrigui al fine di garantire le rese produttive. Con l'ausilio di tecnologie genomiche sarà possibile lo sviluppo di nuove varietà di pomodoro in grado di ridurre l'impatto delle condizioni ambientali sulle caratteristiche qualitative e quantitative delle produzioni di pomodoro con ricadute economiche positive per il mercato del settore agro-industriale.

2 Materiali e Metodi

2.1 Allevamento di diversi genotipi di pomodoro in condizioni di ridotti apporti idrici

2.1.2 Allevamento di piante di pomodoro in sistemi semi-controllati a due differenti livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata

10 linee di pomodoro sono state allevate in mastelli in condizioni semi-controllate nell'estate 2010, presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Bari. I semi di 8 ecotipi di *S. lycopersicum*, IT-22/030-1, IT-22/030-2, IT-22/030-3, IT-22/001, IT-22/009, IT-22/007 e IT-22/025, sono stati resi disponibili dal Prof. L. Ricciardi dell'Università degli Studi di Bari, mentre quelli della varietà M82 di *S. lycopersicum* (Accessione LA3475) e della IL9.2.5 sono stati forniti dal *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). La IL9.2.5 in omozigosi alla regione genomica introgressa dalla specie selvatica *S. pennellii* (LA0716) di pomodoro nel background genomico dalla varietà M82. L'esperimento è stato condotto sotto una copertura orizzontale di policarbonato. In ogni mastelli, dal diametro di 1 m implementati con dispositivi elettronici per il rilevamento automatico dell'umidità del suolo, è stata restituita integralmente l'acqua perduta per evapotraspirazione fino al momento dell'allegagione. Quando il 50% delle piante ha mostrato allegagione nelle infiorescenze dei primi palchi delle piante, l'irrigazione è stata diversificata in due trattamenti corrispondenti a due livelli differenti di apporto di acqua. In particolare, i trattamenti si sono concretizzati nella restituzione di un volume di acqua pari a quella perduta per evapotraspirazione (100%) e di un volume di acqua pari al 50% di quella perduta (50%). Valutazione comparativa della tolleranza ad apporti idrici ridotti è stata effettuata monitorando diversi parametri: epoca di fioritura, epoca di allegagione, precocità, tardività, epoca media di raccolta, frutti fusto principale, produzione frutti fusto principale, peso medio frutti fusto principale, contenuto in solidi solubili frutti fusto principale, frutti di scarto per pianta, produzione di scarto per pianta, peso medio frutto di scarto, produzione pianta complessiva.

2.1.2 Allevamento di piante di pomodoro in vaso in condizioni controllo e di stress idrico

Differenti genotipi di pomodoro della cultivar M82, della linea d'introggressione IL 9.2.5 e del genotipo IT025 (reso disponibile dal prof Ricciardi dell'Università di Bari) sono stati allevati nelle serre del Dipartimento di Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e dell'Ambiente in contenitori alveolari (germinatoi) da 170 fori. Il numero di semi utilizzati nella prova è stato tra 60 per genotipo. Successivamente 45 piante per genotipo sono state trapiantate in vaso da 22 cm

di diametro e irrigate per circa 40 giorni. In particolare, lo stress idrico è stato imposto interrompendo l'irrigazione per 16 giorni, in seguito le piante sono state irrigate per 7 giorni e un secondo ciclo di stress idrico è stato imposto per ulteriori 8 giorni. In collaborazione con i ricercatori dell'istituto CNR-ISAFOM di Ercolano sono stati valutati alcuni parametri fisiologici della risposta alle condizioni di deficit idrico imposte. Inoltre, sono state prelevate foglie dei diversi genotipi, in differenti momenti dell'allevamento e dell'imposizione dello stress idrico, per le successive analisi biochimiche e molecolari. I campioni sono stati quindi congelati in N₂ liquido e conservati a -80° C.

2.1.3 Contenuto d'umidità relativo del suolo

Il contenuto d'umidità relativo dei vasi (Θ) è stato costantemente monitorato mediante l'utilizzo di sonde TDR (*Time Domain Reflectometry*) che sono state applicate a tre vasi per ogni genotipi e per ogni trattamento idrico. I valori di Θ (m³m⁻³) sono stati stimati al mattino.

2.1.4 Allevamento di piante di pomodoro in coltura idroponica e imposizione dello stress idrico mediato da PolyEtilenGlicole (PEG)

Semi di pomodoro *S. lycopersicum* cv M82 e della linea d'introggressione IL9.2.5 (Zamir *et al.*, 1995) sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 3 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in vaschette in cui è stata somministrata la soluzione nutritiva descritta in tabella 1 (G. Colla, Università degli studi della Tuscia, non pubblicato). Le piante sono state allevate in camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (26°C/18°C), fotoperiodo (18h luce/6h buio), irradianza (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ed umidità (60%). sono state allevate in coltura idroponica in condizioni normali e di stress idrico, in celle climatizzate. Dopo circa 20 giorni di crescita dalla semina, stadio in cui le piante avevano completamente sviluppato la seconda coppia di foglie vere, su di un gruppo di piante è stato imposto lo stress idrico mediante aggiunta di PolyEtilenGlicole (PEG), peso molecolare 8000 (Sigma-Aldrich), alla soluzione nutritiva alle concentrazioni del 7,5% e del 15%. Sui genotipi sottoposti a stress idrico e su quelli allevati in condizioni controllo, sono stati effettuati dei prelievi di campioni di foglie e radici dopo 24h ore dall'inizio del trattamento con PEG 7,5% e dopo le successive 24h, 48h e 72h dal trattamento con PEG 15%. I campioni sono stati quindi congelati in N₂ liquido e conservati a -80° C per le successive analisi.

Tabella 1. Composizione del mezzo di coltura idroponica.

Soluzione Nutritiva	
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	384 mg/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	812,9 mg/L
KNO ₃	101,5 mg/L
K ₂ SO ₄	319,3 mg/L
KH ₂ PO ₄	204,8 mg/L
Hidromix	14,0 mg/L

2.2 Analisi Fisiologica

2.2.1 Conduttanza stomatica e assimilazione fotosintetica

La Conduttanza stomatica fogliare ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-2}$) e l'assimilazione fotosintetica (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sono state rilevate in pieno giorno, mediante analizzatore Licor-6400 (USA) con sistema aperto “*steady-state*”. Su 3 piante per ogni genotipo e per ogni trattamento di disponibilità idrica, si è operato su 1 foglia, inserita nella porzione apicale dei rametti, e ben esposta alla luce. Gli scambi gassosi sono stati valutati in accordo con il modello di Von Caemmerer e Farquar (1981).

2.2.2 Potenziale idrico fogliare

Potenziale idrico fogliare (Ψ_w) è stato misurato mediante camera a pressione di tipo Scholander (SAPS II, modello 3115, Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara CA, U.S.A). Il potenziale idrico è stato effettuato in pieno giorno su 3 piante per ogni genotipo e per ogni trattamento di disponibilità idrica, operando su 1 foglia, prelevata dalla parte mediana della chioma.

2.2.3 Analisi della fluorescenza massima della clorofilla “a”

La fluorescenza della clorofilla “a” è stata determinata mediante l'impiego di un fluorimetro portatile (Handy PEA, v. 1.30, Hansatech, UK), ad eccitazione continua, su foglie adattate al buio per 20-30 min. In questo modo è stata misurata la massima resa quantica del fotosistema PSII, definita come il rapporto tra la fluorescenza variabile e la fluorescenza massima (F_v/F_m) su 6 piante per ogni genotipo operando su 1 foglia, per ogni trattamento di disponibilità idrica.

2.3 Determinazione biometrica

2.3.1 Peso fresco e secco di tessuti di pomodoro

In collaborazione con i ricercatori del CNR-ISAFOM di Ercolano, sono stati determinati il peso fresco e il peso secco delle radici, del fusto, delle foglie e dei frutti. La determinazione di tali parametri è stata condotta sui i vari genotipi di pomodoro, allevati in vaso in condizioni controllo e di deficit idrico, al termine del secondo ciclo di stress e dopo aver ripreso l'irrigazione per le successive 24 h. Nel processo di misurazione si sono prima rimosse le piante dai vasi, per poi pulire ed asciugare delicatamente e rapidamente (per evitare l'eccessiva perdita d'acqua), con carta assorbente morbida le radici prelevate. Di ogni trattamento, controllo e stress idrico, e di ogni genotipo sono state raccolte 3 piante. Si è misurato il peso fresco utilizzando una bilancia da precisione. In seguito i campioni sono stati messi in stufa a 40°C per 48 o 72 ore (a secondo del tempo richiesto per l'essiccazione), per poi essere nuovamente pesati per la determinazione del peso secco.

2.3.2 Area fogliare

La superficie fogliare è stata misurata acquisendo l'immagine con uno scanner. In seguito, utilizzando il software Image J® , è stata analizzata l'immagine da un punto di vista cromatico, ed è stata calcolata la superficie fogliare media per trattamento in mm².

2.3 Analisi biochimica

2.3.1 Determinazione del contenuto di prolina libera.

Foglie di pomodoro, allevate in condizione di stress idrico sia in vivo che in coltura fuori suolo, sono state prelevate ed analizzate per il contenuto di prolina libera. L'estrazione è stata condotta secondo il metodo descritto da Clausen *et al.*, (2005). 250 mg di tessuto vegetale sono stati macinati in N₂ liquido. Il macinato è stato risospeso in una soluzione acquosa di acido 5-sulfosalicilico diidrate (3%, w/v). La sospensione è stata chiarificata mediante filtri Ederol rundfilter (Schleicher & Schull). Un millilitro di filtrato è stato diluito in 1 ml di acido acetico glaciale ed 1 ml di soluzione di 2,5% (w/v) ninidrina (acido acetico glaciale, acqua distillata e 85% acido ortofosforico in rapporto 6:3:1). Tre millilitri della soluzione ottenuta sono stati incubati a 100°C per un'ora. Un millilitro di soluzione è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 546 nm. Le analisi sono state effettuate in triplicato, considerando almeno tre repliche biologiche.

2.3.2 Determinazione del contenuto di ABA

Foglie e radici di piante di pomodoro prelevate in diverse fasi sperimentali dell'imposizione dello stress idrico sia in vaso che in coltura idroponica, sono state saggiate per il contenuto in acido abscissico (ABA). L'acido abscissico è stato quantificato mediante saggio indiretto ELISA usando il kit Phytodetek ABA test (Agdia Incorporated, In, USA). Circa 150 mg di tessuto fogliare è stato macerato in N₂ liquido, i campioni ottenuti sono stati risospesi in 2 mL di H₂O sterile e lasciati in agitazione per 16 ore al buio a 4°C. I campioni sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 min e i corrispettivi surnatanti sono stati recuperati e diluiti di 50 volte in un opportuno buffer salino (25 mM trizma Base, 100 mM NaCl e 1 mM MgCl₂·6H₂O). Il saggio ELISA è stato condotto seguendo il protocollo indicato dal fornitore. La quantificazione dell'ABA è stata effettuata su tre repliche biologiche.

2.4 Trasformazione di pomodoro

Al fine di ottenere piante di pomodoro *Lycopersicon esculentum* cv. M82 stabilmente trasformate con geni differenzialmente espressi in bocci fiorali di pomodoro è stato utilizzato il protocollo di van Roekel opportunamente modificato (van Roekel *et al.*). Di seguito sono indicate tutte le fasi sperimentali del protocollo di trasformazione utilizzato.

2.4.1 Substrati utilizzati

I substrati utilizzati per la trasformazione sono riportati di seguito in tabella 2 e sono stati preparati secondo le indicazioni presenti nel catalogo Duchefa (Catalogue 2008-12).

Tabella 2. Substrati utilizzati per la trasformazione di pomodoro.

	TRI1	MS0	GCF10	GCF11	MS30
Sali MS	2,2 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	-
Sali MS con vitamine	-	-	-	-	4,3 g/L
Tiamina	0,2 mg/L	0,4 mg/L	0,4 mg/L	0,5 mg/L	-
Myo-Inositolo	50 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	-
Glicina	-	-	-	2 mg/L	-
Piridossina	-	-	0,5 mg/L	0,5 mg/L	-
Acido folico	-	-	-	0,5 mg/L	-
Biotina	-	-	-	0,05 mg/L	-
Zeatina riboside	-	-	1,5 mg/L	1,9 mg/L	-
NAA	-	-	-	-	-
IAA	0,2 mg/L	-	0,2 mg/L	-	-
Acido nicotinico	-	-	0,5 mg/L	4,9 mg/L	-
Saccarosio	15 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Carbenicillina	-	-	500 mg/L	500 mg/L	250 mg/L
Kanamicina	-	-	50±10 mg/L	50±10 mg/L	25 mg/L
Agar	8 g/L	-	8 g/L	8 g/L	8g/L
pH	5,9	5,8	5,9	5,9	5,8

2.4.2 Sterilizzazione e germinazione dei semi

Semi di pomodoro sono stati sterilizzati con una soluzione di sodio ipoclorito commerciale 10% ed SDS 0,1% per 10 min. I semi sono stati ulteriormente sterilizzati con due lavaggi consecutivi di 5 min e di 1 min con una soluzione di etanolo 70%. In seguito è stato effettuato un lavaggio dei semi per 5 volte con acqua sterile autoclavata. I semi sterilizzati sono stati posizionati a distanza di ~0,5 cm in scatole di tipo Magenta contenenti TRI I e lasciati germinare in camera di crescita a 25°C e 80-100 µE con fotoperiodo 16 ore di luce. Le piantine sono state utilizzate quando i cotiledoni erano ben evidenti e non erano presenti foglie vere (circa dopo 7-8 giorni).

2.4.3 Coltura di cellule di *A. tumefaciens* LBA4404.

Il ceppo di *A. tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983) contenente il pTi helper pAL4404 è stato utilizzato per la trasformazione genetica di *L. esculentum*. Le cellule di *Agrobacterium tumefaciens* erano precedentemente state trasformate con gli opportuni vettori binari ricombinanti disponibili presso i laboratori del CNR-IGV di Portici.

Una singola colonia di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 è stata fatta crescere in un in 10 mL del mezzo di coltura AB contenente: 3 g/L K₂HPO₄, 1 g/L NaH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0,3 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0,15 g/L KCl, 0,01 g/L CaCl₂, 2,5 mg/L FeSO₄ · 7H₂O, 0,5% glucosio) (Chilton *et al.*, 1974). La coltura batterica è stata fatta crescere in presenza di 50 mg/L rinfampicina, di 250 mg/L streptomina e di 50 mg/L spectinomicina ed incubata a 28°C per 16 ore in agitazione a 180 rpm. 3 mL di tale coltura sono stati inoculati in 50 mL del mezzo di crescita AB con gli opportuni antibiotici e con l'aggiunta di glucosio al 2%. L'incubazione è stata sempre effettuata a 28°C a 180 rpm per 16 ore. Per due volte consecutive, la coltura batterica è stata centrifugata a 4000 rpm per 10 min a temperatura ambiente in tubi (Falcon) e risospesa in 50 mL del mezzo MS0. Infine è avvenuta la risospensione del pellet fino al raggiungimento di un'assorbanza di 0,6 OD.

2.4.4 Co-coltivazione di espianti e *A.tumefaciens*

I cotiledoni sono stati processati come di seguito descritto. È stato effettuato un taglio trasversale dei cotiledoni delle piantine in modo da poter ottenere frammenti di circa 5 mm. Circa 32 espianti sono stati immersi immediatamente in MS0 liquido in piastre petri e non sono stati messi a contatto con Agrobatterio. In seguito sono stati posizionati su una piastra con GCF10 e un dischetto di carta Whatman ed utilizzati come controlli. Per i restanti espianti si è proseguito con la loro immersione in una piastra petri contenente la sospensione di Agrobatterio e con la loro incubazione per 10 min. Gli espianti sono stati trasferiti su 3 dischetti di carta Whatman e posizionati con la pagina superiore rivolta in basso sul terreno GCF10 con 375 µM acetosiringone e un disco di carta Whatman sterile. L'incubazione in co-coltivazione degli espianti e *A. tumefaciens* è stata effettuata per 2 giorni al buio a 26°C.

2.4.5 Coltura degli espianti

Al termine dei due giorni di co-coltura, si è proceduto al trasferimento degli espianti con la faccia superiore verso il basso in piastre di GCF10 con 500 mg/L carbenicillina e 50 mg/L kanamicina. Sono stati trasferiti 16 dei 32 espianti di controllo su GCF10 (controllo rigenerazione) e i restanti 16 su GCF10 con 500 mg/L carbenicillina e 50 mg/L kanamicina (controllo selezione). Il "controllo di selezione" assicura l'efficacia dell'antibiotico utilizzato nel

selezionare gli espianti. Il “controllo di rigenerazione” assicura, invece, che le componenti del substrato colturale impiegato favoriscano la callogenesi e la formazione di germogli.

Al termine della prima settimana di rigenerazione, si è proceduto con il trasferimento degli espianti su terreno di selezione fresco GCF10 con 500 mg/L carbenicillina e 40 mg/L kanamicina. Tale trasferimento è stato ripetuto ad intervalli di due settimane.

Alla formazione dei primi calli dopo circa cinque settimane, questi ultimi sono stati trasferiti su terreno GCF11. Ogni due settimane tutti i calli sono stati trasferiti su terreno GCF11 fino alla formazione dei germogli veri.

2.4.6 Radicazione dei germogli, propagazione *in vitro* e trasferimento in vivo

Alla formazione dei germogli veri, dopo circa nove settimane, è stato effettuato trasferimento su mezzo MS30 con vitamine in presenza di 500 mg/L carbenicillina e di 40 mg/L kanamicina. Le piante con un buon apparato radicale sono state micropropagate *in vitro* su MS30 con 250 mg/L carbenicillina, 25 mg/L kanamicina e NAA 0,1 mg/L. I cloni di ogni pianta micropropagata sono stati trasferiti in *plateau* di polistirolo chiusi da una pellicola trasparente per ridurre lo stress evapotraspirativo.

2.4.7 Allevamento del materiale transgenico

Il materiale vegetale è stato allevato in vivo in camera di crescita climatizzata a 24°C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, in condizioni di luminosità di 5000 lux. Dopo circa 10 giorni dal trasferimento nel *plateau* sono stati trasferiti in vasi di 20 cm di diametro, contenenti una miscela di terreno sterile. A crescita avvenuta e, in seguito alla maturazione delle bacche, i semi sono stati estratti mediante trattamento con HCl 3⁰/₀₀ per una notte. L'HCl è stato allontanato mediante diversi lavaggi con acqua sterile, i semi sono stati conservati in una camera climatizzata a 4°C.

2.5 Screening delle piante trasformate

Le piante ottenute dalla trasformazione sono state sottoposte ad uno *screening* molecolare che ha previsto: estrazione del DNA genomico, quantificazione e selezione delle piante trasformate mediante amplificazione di un'opportuna regione del gene d'interesse.

2.5.1 Estrazione del DNA genomico e quantificazione

Il DNA delle piante della progenie T₀ e T₁ è stato estratto seguendo il protocollo Fulton (Fulton *et al.*, 1995). Circa 50-100 mg di foglia sono stati prelevati e macerati in azoto liquido in

tubi eppendorf da 2 mL. Il tessuto macerato è stato incubato a 65°C per 30-120 min nel tampone “*Microprep buffer*”. Quest’ultimo è così costituito da: 2,5 parti di buffer di estrazione di DNA (0,35 M Sorbitolo, 0,1 M Tris-base, 5mM EDTA, pH 7,5), 2,5 parti di buffer di lisi (0,2 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB), 1 parte di sarcosyl 5% p/v e 0,3 g di bisolfito di sodio. Al termine dell’incubazione, i tubi eppendorf sono stati riempiti con una soluzione cloroformio-alcool isoamilico (24:1) e miscelati bene tramite inversione. I campioni sono stati centrifugare a 10000 rpm per 5 min. E’ stata prelevata la fase acquosa e trasferita in nuovi tubi eppendorf. A questi è stato aggiunto 2/3-1 volume di isopropanolo freddo e invertiti i tubi fin quando il DNA precipita. I campioni sono stati centrifugati immediatamente a 10000 rpm per 5 min, e l’isopropanolo è stato allontanato. Il pellet è stato lasciato asciugare per 5-10 min. Si è proceduto al lavare il pellet con etanolo al 70%, centrifugando come al punto precedente e asciugandolo per 10 minuti. I campioni di DNA sono stati risospesi in 50 µL di acqua sterile e incubati a 65°C per 10 min.

Il DNA estratto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio per verificarne la qualità e stimarne la concentrazione attraverso confronto con concentrazioni note del DNA del fago λ.

2.5.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Per discriminare gli effettivi trasformanti è stata amplificata una regione compresa tra il promotore (promotore costitutivo 35S CaMV o quello heat stress inducibile LeHsp23,8) e la CDS dei geni d’interesse, mediante PCR utilizzando gli opportuni primer che sono riportati in tabella 2, La PCR è stata allestita con circa 150 ng del DNA estratto cui sono stati aggiunti 2 µl Buffer 10X (Invitrogen), 0,4 µl dNTP 10 mM, 1,0 µl per entrambi i primer 10 mM e 0,1 µl di Taq 1 U/µl (Invitrogen). La miscela di reazione è stata portata ad un volume finale di 20 µl con acqua distillata ed incubata nel termociclatore Applied Biosystem gene amp 2700. Il ciclo base di amplificazione è stato di 95°C per 45 sec, 56 °C per 45 sec e di 72°C per 45 sec. Tale ciclo è stato preceduto da una fase iniziale di denaturazione (95°C per 5 min) e seguito da una fase di polimerizzazione finale (72°C per 7 min). Un’aliquota di 10 µl dei prodotti di amplificazione sono stati preparati con 2 µl di Loading Dye 6X e sono poi stati caricati su gel di agarosio 1,2%. La corsa elettroforetica è stata effettuata applicando una differenza di potenziale di 5 V/cm per 45 min e la visualizzazione delle bande è stata ottenuta attraverso esposizione ai raggi UV.

Tabella.3. Sequenze dei primer usati per lo *screening* delle piante trasformate e per l'analisi RT-PCR semiquantitativa.

Nome sequenze	Sequenze primer 5'→3'
35S CaMV For	CTGGATTGATGTGATATCTCC
LeHsp23,8 For	TCGTAAGGGCGAAGAAGA
Flag For	GACTACAAGGATGACGATGACAAG
HSFA2 Rev	CCTCCCAGAAAACCTCCATT
HSP17,6 Rev	ATTTCCCAACCCTTCTCTCC
OEC Rev	CCTTTATCCCAGACCAT
TGF Rev	TCAAGATTCATGCAAGAGTCTATA
MPK16 Rev	TTAATACCATTGATTACCAGGTC
NDPK Rev	CATGGATTTGAGGTT
HSP17,4Rev	GGGGACAAGTTGTA

2.6 Studio d'espressione genica

2.6.1 Estrazione di RNA totale

Prima dell'estrazione di RNA sia le soluzioni che la vetreria utilizzate sono state trattate con dietil pirocarbonato (DEPC) allo 0,1% per inattivare eventuali RNAsi cellulari contaminanti e poi sterilizzate in autoclave a 120 °C per 30 min, per disattivare il DEPC. L'RNA totale è stato isolato da tessuti di pomodoro conservati a -80°C usando 100 mg di tessuto macerato, cui è stato aggiunto un 1 ml di Trizol. I campioni sono stati incubati per 5 min a temperatura ambiente e sono stati centrifugati per 15 min a 12000 g a 4°C. Al surnatante dei campioni sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio ed è stata effettuata un'incubazione per 10 min a temperatura ambiente. Poi è stata effettuata una centrifugazione a 12000 g per 15 min a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata ed è stata effettuata la precipitazione dell'RNA aggiungendo 250 µl di isopropanolo e 250 µl di una soluzione salina (0,8M NaCl e 2,4 M Sodio Citrato) per 10 min a temperatura ambiente. Dopo la successiva centrifugazione a 12000 rpm (15 min, 4 °C) i pellet sono stati lavati con etanolo al 75%. I campioni sono stati risospesi in 30 µl di H₂O sterile RNasi Free, dopo essere stati fatti asciugare per 10 min. L'RNA così ottenuto è stato impiegato in diverse analisi qRT-PCR e RT-PCR.

La concentrazione dei campioni di RNA estratti è stata determinata mediante lettura al NanoDrop 1000 Spectrophotometer v 3,60. La purezza dell'estrazione (assenza di eventuali sostanze contaminanti, quali proteine, polisaccaridi e fenolo), è stata stimata dalla misura del rapporto assorbanza A O.D 260/O.D 280 e O.D 260/ O.D 230. I campioni sono stati considerati per le successive analisi quando i rapporti A O.D 260/A O.D 280 e A O.D 260/A O.D 230 presentavano un valore compreso tra 1,8 e 2,0.

2.6.2 Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA

I campioni di RNA sono stati esaminati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% per verificare l'assenza di eventuale degradazione e contaminazione di DNA genomico residuo.

Tampone MOPS 10X:

Acido N-morfolino-propansulfonilico pH 7 0,2 M

Sodio acetato 80 mM

EDTA 10 mM

Tampone denaturante:

Formammide 750 µl

10X MOPS 120 µl

37% formaldeide 250 µl

10 µg/µl bromuro di etidio 1 µl

Gel di agarosio/formaldeide (60 ml):

Agarosio (1,2%) 0,75 g

1X MOPS 6 ml

Formaldeide 3,5 ml

H₂O sterile 50,5 ml

I campioni eluiti nel tampone denaturante sono stati incubati per 5 min a 65°C e successivamente sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% in condizioni denaturanti per la presenza di formaldeide al 6%, La corsa è stata condotta a 50 V costanti, utilizzando come tampone il MOPS 1X, in una camera elettroforetica previamente trattata con H₂O₂ ed etanolo assoluto, per allontanare eventuali RNasi contaminanti, L'integrità dell'RNA è stata controllata su un transilluminatore per la presenza delle bande relative alle subunità 25S e 18S dell'RNA ribosomiale, il cui rapporto 2:1 è indicativo di assenza di degradazione,

2.6.3 Sintesi del cDNA.

Ad 1 µg RNA totale sono stati aggiunti 1 µl 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µl DNase I, Amp Grade, 1 U/µl e H₂O DEPC fino ad un volume di 10 µl. I tubi sono stati incubati per 15 min a temperatura ambiente. La DNase I è stata inattivata sia con l'aggiunta di 1 EDTA 25 mM alla miscela di reazione che con incubazione a 65°C per 10 min. L'RNA messaggero è stato retroscritto utilizzando il kit Superscript II (Invitrogen) che prevede l'aggiunta ad 1 µg di RNA-DNA FREE di 1 µl di oligo (dT)18-20 primer (0,5 µg/ µl) e di 1 µl di 10mM dNTP mix seguita da un'incubazione della miscela a 70°C per 5 min. Al termine di questa reazione ai campioni, dopo essere stati posizionati in ghiaccio, sono stati aggiunti 4 µl di 5X First Strand buffer e 2ul di DTT 0,1 M. Si è proceduto con un'incubazione per 2 min a 42°C. In seguito è

stato aggiunto 1 µl di enzima Superscript II RT (200 U). La reazione è stata incubata per 50 min a 42°C, al termine dei quali la retrotrascrizione è stata arrestata incubandola a 70°C per 15 min.

2.6.4 Controllo della sintesi del cDNA

L'avvenuta sintesi del cDNA è stata accertata attraverso l'amplificazione di una porzione del gene Ef1- α , costitutivo in pianta, utilizzando i primer LeEf RT Fw e LeEf RT Rw (tab. 2) che appaiano fra due esoni consecutivi del gene LeEF1- α , espresso costitutivamente in tutti i tessuti vegetali di pomodoro (Pokalsky *et al*, 1989). Questi primer hanno la capacità di discriminare fra DNA genomico e cDNA in quanto quest'ultimo non possiede le sequenze introniche e quindi produce un frammento di amplificazione (687 bp) più piccolo rispetto al DNA genomico (767 bp). 1 µl di cDNA è stato utilizzato come template ed è stata allestita la reazione PCR come è stato descritto nel paragrafo 2.6.3.

2.6.5 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) semiquantitativa

Questa tecnica prevede l'isolamento del RNA e la sintesi del primo filamento di DNA complementare (cDNA) all'RNA messaggero e la successiva amplificazione di sequenze specifiche tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR). Per lo studio d'espressione dei geni esogeni delle piante trasformate sono stati utilizzate le opportune coppie di primer indicate in tabella 3.

2.6.6 Real-time PCR (qRT-PCR)

Lo studio di espressione di geni di interesse è stata effettuata mediante Real Time PCR (qRT-PCR). Il cDNA, ottenuto come indicato nel paragrafo 2.3.3, è stato amplificato con la SybrGreen PCR Master Mix (Invitrogen), utilizzando il sistema di rilevazione e di analisi dell'Applied Biosystem (ABI PRISM 7900). La reazione PCR è stata allestita utilizzando 4,25 µl di cDNA, diluito 20 volte, come template ed aggiungendo 12,5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Kit (Invitrogen) e 4,28 µM oligo forward, 4,28 µM oligo reverse, H₂O bidistillata fino ad un volume finale di 12,5 µl. L'amplificazione è stata condotta secondo i seguenti parametri per 40 cicli totali: denaturazione 95°C per 15 sec; annealing ed estensione 60°C per 1 min. Gli oligonucleotidi sono stati costruiti in modo tale da avere un amplicone tra 100-140 bp. Le preparazioni delle reazioni sono state automatizzate usando il *Liquid Handler Robot* (Tecan Freedom Evo) della Piattaforma Genopom. Ogni amplificazione è stata ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza sono stati poi analizzati dal software RQ Manager 1,2 (Applied Biosystems) per calcolare i livelli d'espressione relativa (valori dell'RQ -*Relative Quantification*) con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). I valori dell'RQ sono stati

ottenuti utilizzando il gene Elongation Factor 1 α che è stato testato come controllo endogeno della reazione, di cui è stata amplificata una regione utilizzando i primer qRT-LeEF1- α For e qRT-LeEF1- α Rev riportati in tabella 2. I dati ottenuti rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR.

2.6.7 Geni analizzati per l'analisi d'espressione in tessuti di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico

Per lo studio dell'espressione in foglie e in radici di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico, sono stati analizzati i seguenti geni:

- *nced* (Z9721), *cis-epoxycarotenoid dioxygenase*;
- *p5cs* (SGN-U21822), *pyrroline-5-carboxylate synthetase*;
- *phosph* (SGNU218220), *Sl-StarchPL1, starch phosphorylase L-1*;
- *aco* (X58273), *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase*;
- *mkp1*, (AF31274), *MAP1 Kinase phosphatase*;
- *erd15* (KC158288), *dehydration induced protein ERD15*;
- *lea* (SGN-U213276), *Late embryogenesis abundant protein*;
- *cdsp32* (TC183374), *Chloroplast drought-induced Stress Protein of 32kDa*;
- *rgga* (AF3127), *RNA binding protein*.

Tabella 4. Sequenze dei primer utilizzati per l'analisi real-time PCR (qRT-PCR) e per in tessuti di pomodoro allevati in condizioni controllo e di stress idrico.

Nome Primer	Sequenze primer 5'→3'	Nome gene	N° di accessione
qRT-NCED Fw	CATAATCGAAAACCCGGATG	<i>nced</i>	Z9721
qRT-NCED Rw	AACTTTTGGCCATGGTTCAG		
qRT-P5CS Fw	AACTGAGCTTGATGGCAAGG	<i>p5cs</i>	SGN-U21822
qRT-P5CS Rw	ACCAGAGGCTGAGCTGATGT		
qRT-ACO Fw	TCATACAGACGCAGGAGGCAT	<i>aco</i>	X58273
qRT-ACO Rw	GAGGAACATCGATCCATTGG		
qRT-MKP1 Fw	ACGATCCTTTGCATCTCGTC	<i>Mkp1</i>	AF31274
qRT-MKP1 Rw	TGCTTCACATTTCTTACCAATCC		
qRT-ERD15 Fw	AACTGCTGCAAACATAACATCTGA	<i>erd5</i>	AF31274
qRT-ERD15 Rw	CCATTGGTCCACCCAAATAC		
qRT-LEA Fw	AGCGATGCTCCTCACTTGTT	<i>lea</i>	TC116286
qRT-LEA Rw	CGAAGGAGAAGGCTAGTGGA		
qRT-RGGA Fw	GCTTAAGACTGAGGAAAGGA	<i>rgga</i>	AK323828.1
qRT-RGGA Rw	GGAAGTGACCTGGGTCTTCA		
qRT-EF Fw	GGTCACCTTGGCACCAGTTG	<i>LeEf1 α</i>	X53043
qRT-EF Rv	CTCCATTGGGTCGTTTTGCT		

2.6.8 Geni analizzati per l'analisi d'espressione in tessuti di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico

Per l'analisi d'espressione genica in fogli e in antere di piante allevate in condizioni di temperature controllo e di alte temperature, sono stati analizzati i seguenti geni:

- *hsp17.6* (U72396) che codifica per la piccola *heat shock protein* di classe II;
- *hsp17.4* (AF090115) che codifica per la piccola *heat shock protein* di classe II;
- *hsfA.2* (X67601) che codifica per il fattore trascrizionale HsfA2.

Tabella 5. Sequenze dei primer utilizzati per l'analisi real-time PCR (qRT-PCR) e per in tessuti di pomodoro allevati in condizioni controllo (25°C) e di Heat stress (36°C).

Nome Primer	Sequenze primer 5'→3'	Nome gene	N° di accessione
qRT-HsfA2 For	CTCTTGTTGTTTCCCCTGGCC	<i>hsfA2</i>	X67601
qRT-HsfA2 Rev	GCGACCATAACTCTATCCTTCCC		
qRT-Hsp17,6-CII For	GATGGAGAGAAGGGTTGGGAA	<i>hsp17.,6</i>	U72396
qRT-Hsp17,6-CII Rev	AATTGTTTTGGGTTTCTTTGGC		
qRT-Hsp17,4-CII For	GTTCGTGATGCTAAGGCATGG	<i>hsp17.4</i>	AF090115
qRT-Hsp17,4-CII For	TCTCCAGATTCAACCCTGGC		
qRT-LeEF1- α For	CTCCATTGGGTCGTTTTGCT	<i>LeEF1-α</i>	X53043
qRT-LeEF1- α Rev	GGTCACCTTGGCACCAGTTG		

2.7 Germinazione *in vitro* e analisi della vitalità di granuli pollinici di pomodoro.

Antere da bocci fiorali di 10 mm, al primo giorno di antesi, di piante di pomodoro sono state raccolte di pomeriggio e vortexate per rimuovere i granuli pollinici. È stato analizzato il polline sia di piante di pomodoro transgeniche che del genotipo *wildtype* cv M82, allevate in condizioni controllo (25°C) e in condizioni di alte temperature (*heat stress*, 36°C). Per ogni linea transgenica analizzata, il polline è stato raccolto da 7 a 18 piante allevate in condizioni controllo; mentre per quelle allevate in condizioni di *heat stress* da 7 a 14 piante. Per il genotipo *wild type* sono stati prelevati 14 e 13 fiori per il controllo e per lo stress termico, rispettivamente. I campioni sono stati incubati al buio a 25°C *over night*, in agitazione 180 rpm ed in una soluzione di germinazione così composta: 20 mM MES, pH 6,0, 3 mM Ca(NO₃)₄H₂O, 1 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄·7H₂O, 1,6 mM H₃BO₃, 24 % PEG (glicole polietilenico) 4000, 2,5 % saccarosio (Zhang *et al.*, 2008). In seguito, i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 6 min. I pellet sono stati risospesi in 200 μ l H₂O sterile. I campioni sono stati di nuovo centrifugati a 4000 rpm per 6 min e infine risospesi in 30 μ l H₂O sterile.

I granuli pollinici sono stati colorati aggiungendo ai campioni 10 μ l di soluzione di coloraggio di Alexander. La soluzione di coloraggio è stata preparata aggiungendo i seguenti costituenti: 10

mL 95% etanolo, 1 mL verde malachite (1% in 95% etanolo), 50 mL H₂O distillata, 25 mL glicerolo, 5 mL fucsina acida (1% in H₂O), 0,5 mL Orange G (1% in H₂O), 4 mL acido acetico glaciale, 5g fenolo e acqua distillata a 100 mL.

Il polline è stato classificato come germinato quando il tubo pollinico era maggiore del diametro dei granuli pollinici. Inoltre, quelli non germinati sono stati ulteriormente classificati come vitale e non-vitali quando il loro citoplasma si colorava di violetto o di verde, rispettivamente. La vitalità totale è stata calcolata considerando la somma dei granuli pollinici vitali e germinati. Per ciascun esperimento sono stati contati tra 84 e 1184 granuli pollinici.

3 Risultati

3 Caratterizzazione bio-agronomica di genotipi di pomodoro in risposta a ridotti input idrici

Allo scopo di valutare la risposta allo stress da ridotto apporto idrico di diversi genotipi di pomodoro, 10 linee di pomodoro sono state allevate in vasconi in condizioni semi-controllate nell'estate 2010, presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Bari. Le piante sono state irrigate con due differenti volumi di adacquamento corrispondenti al 100% e al 50% della piena capacità di campo per le piante completamente irrigate (irriguo) e per le piante sottoposte a stress idrico (stressato), rispettivamente. Per la sperimentazione sono stati utilizzati i seguenti genotipi: la linea M82 di *S. lycopersicum*, due linee di introgressione, IL 8.3 e IL 9.2.5, ottenute dall'incrocio di *S. pennelli* con il genitore ricorrente M82 e riportate come tolleranti a condizioni di deficit idrico, e di 8 ecotipi di *S. lycopersicum* (IT-22/030-1, IT-22/030-2, IT-22/030-3, IT-22/001, IT-22/009, IT-22/007 e IT-22/025) selezionati dalla collezione di germoplasma pugliese dal Prof. L. Ricciardi dell'Università degli Studi di Bari. Sono stati valutati i seguenti caratteri bio-agronomici sia per le piante controllo che per quelle sottoposte a stress idrico: epoca di fioritura, epoca di allegagione, precocità, tardività, epoca media di raccolta, frutti fusto principale, produzione frutti fusto principale, peso medio frutti fusto principale, contenuto in solidi solubili frutti fusto principale, frutti di scarto per pianta, produzione di scarto per pianta, peso medio frutto di scarto ed infine produzione pianta complessiva. Sono riportati in tabella 6 alcuni dei risultati più significativi ottenuti. In condizioni di stress si riducono significativamente tutti i caratteri legati alla produzione in tutti i genotipi. Una riduzione dell'irrigazione, pari al 50 % della capacità di campo massima, determina una riduzione della produzione per pianta come atteso in tutti i genotipi. Per il genotipo M82 si osserva un calo produttivo di circa 4 volte; mentre per la cultivar IT-22/025 la produzione per pianta si riduce di non oltre il 43 %. Anche i valori della la produzione dei frutti del fusto principale, si riducono in seguito a stress idrico di circa il 50% in tutti e dieci i genotipi analizzati. Un ulteriore parametro analizzato è stato il contenuto in solidi solubili dei frutti del fusto principale che è ,in condizioni irrigue, compreso tra 6,8 e 4,3 °Brix. Tale parametro nelle piante stressate aumenta con valori compresi tra 8,7 e 5,6 °Brix in alcuni genotipi e non in quelli che mostrano caratteristiche di tolleranza. I parametri bio-agronomici, produzione frutti fusto principale e produzione complessiva pianta, sono stati quindi utilizzati per la determinazione dell'indice di Blum noto come “*injury index*” (Blum *et al.*, 1988) che permette di classificare la risposta di un genotipo allo stress idrico per i differenti parametri studiati.

Tabella 6. Valori medi di 4 caratteri bio-agronomici registrati su 10 genotipi di *Lycopersicon esculentum* allevati in condizioni semi controllate e con 2 differenti volumi di adacquamento (Irriguo e Stressato).

Irriguo							
Genotipo	Peso medio frutto (g)	Genotipo	Produzione per pianta (g)	Genotipo	Produzione frutti fusto principale (g)	Genotipo	Contenuto in solidi solubili frutti fusto principale (°Brix)
M82	74,3 A	IT-22/009	796,0 A	IT-22/009	1216,2 A	IT-22/030-3	6,8 A
IL 9.2.5	69,2 A	IT-22/007	760,0 A B	IT-22/001	1018,3 A B	IT-22/030-1	6,4 A B
IT-22/009	66,2 A	IT-22/001	625,0 A B C	IT-22/030-3	992,0 A B	IT-22/030-2	6,1 A B
IL8-3	65,8 A	IT-22/025	608,6 A B C	IT-22/030-2	794,2 A B C	IT-22/007	5,6 A B C D
IT-22/030-1	53,3 A B	IT-22/030-2	562,0 A B C	IT-22/025	787,3 A B C	IT-22/025	5,6 A B C D
IT-22/007	51,1 A B C	IT-22/030-1	501,1 B C	M82	595,0 B C	IT-22/009	5,3 B C D
IT-22/030-3	35,5 B C	M82	482,9 B C	IT-22/007	553,0 B C	IL 9-2-5	5,3 B C D
IT-22/001	33,7 B C	IL 9.2.5	470,6 B C	IL 9.2.5	524,6 B C	IL 8-3	5,0 B C D
IT-22/030-2	29,6 B C	IL 8.3	407,1 C	IL 8.3	356,0 C	IT-22/001	4,9 C D
IT-22/025	27,4 C	IT-22/030-3	395,5 C	IT-22/030-1	307,7 C	M82	4,3 D
Stressato							
Genotipo	Peso medio frutto (g)	Genotipo	Produzione per pianta (g)	Genotipo	Produzione frutti fusto principale (g)	Genotipo	Contenuto in solidi solubili frutti fusto principale (°Brix)
IT-22/009	38,2 A	IT-22/025	352,3 A	IT-22/009	667,2 A	IT-22/030-1	8,7 A
IL 9.2.5	30,3 A B	IT-22/009	298,2 A B	IT-22/025	617,5 A	IT-22/030-3	7,5 B
IT-22/007	26,9 A B C	IT-22/030-3	249,2 A B C	IT-22/001	605,1 A	IT-22/030-3	7,2 B
M82	25,9 A B C	IT-22/001	241,2 A B C	IT-22/030-2	415,0 B	M82	6,4 B C
IL8-3	21,0 B C	IT-22/007	219,8 A B C	IT-22/030-3	330,6 B C	IL 8-3	6,3 B C
IT-22/025	20,9 B C	IT-22/030-2	208,5 B C	IT-22/007	328,7 B C	IL 9-2-5	5,7 C
IT-22/030-1	17,7 B C	IL 9.2.5	169,0 B C	IL 9.2.5	320,2 B C	IT-22/001	5,7 C
IT-22/030-3	15,9 B C	M82	159,5 B C	IL 8-3	213,9 B C	IT-22/007	5,7 C
IT-22/001	14,4 B C	IL8-3	115,8 C	M82	226,7 B C	IT-22/009	5,6 C
IT-22/030-2	13,8 C	IT-22/030-1	114,5 C	IT-22/030-1	139,4 C	IT-22/025	5,6 C

Dall'analisi dell'indice di Blum è stata evidenziata una risposta differenziale dei dieci genotipi di pomodoro al ridotto regime idrico (tab. 7). La percentuale di danno in termini di perdita di produzione dei frutti del fusto principale è compresa tra il 68,3 % e il 13 %. Simile è l'andamento dell'indice di Blum per la produzione complessiva pianta, che varia da un valore massimo di 68,3 % ad uno minimo di 12,1 %. Il genotipo con il minor indice di danno per la produzione per pianta complessiva è stata la cultivar italiana IT-22/025 (indice di Blum pari a 14,3 %) mentre quella con il massimo valore è stato il genotipo M82 (indice di danno pari al 68,5 %). E' stata stimato un indice di danno intermedio per il genotipo IL9.2.5 (53,2 %). Sulla base dei risultati su riportati, sono stati selezionati per gli studi successivi i genotipi M82, IL9.2.5 e IT22-025. In particolare il genotipo M82 è risultato il più sensibile allo stress idrico mentre l'ecotipo IT-22/025 è risultato quello maggiormente tollerante.

Tabella 7. Indici di tolleranza allo stress idrico ("injurex index" di Blum) determinati per due caratteri bio-agronomici su 10 genotipi di *Lycopersicum esculentum* allevati in condizioni semi-controllate e con differenti volumi di adacquamento¹.

Genotipo	Indice di Blum (%)
	Produzione frutti fusto principale
IT-22/030-3	68,3 a
M82	59,1 a
IT-22/030-1	51,8 a
IT-22/030-2	47,7 a
IT-22/001	46,1 a
IT-22/009	44,9 a
IL 9.2.5	43,8 a b
IL 8-3	37,0 a b
IT-22/007	22,5 a b
IT-22/025	12,1 b
Produzione complessiva pianta	
M82	68,5a
IT-22/030-3	66,4a
IT-22/030-1	62,1a
IT-22/001	56,6a
IT-22/007	54,6a
IL 9.2.5	53,2a
IT-22/009	46,9a
IL 8-3	43,8ab
IT-22/030-2	41,9ab
IT-22/025	14,3 ab

1: medie non aventi lettere comuni differiscono statisticamente allo 0,05 P (Test SNK.)

3.2 Studio dei meccanismi fisiologici e molecolari della risposta a condizioni di stress idrico in pomodoro

Allo scopo studiare i meccanismi di risposta a condizioni di stress idrico ed identificare parametri fisiologici, biochimici e molecolari correlati con la capacità di tollerare le condizioni di stress, sono stati utilizzati due sistemi sperimentali uno basato sull' allevamento di diversi genotipi di pomodoro *in vivo* in condizioni controllo e di carenza idrica imposta dall'interruzione dell'irrigazione e l'altro basato sull'allevamento in coltura idroponica con condizioni di stress idrico imposte dall'aggiunta di PolyEtilenGlicole (PEG) nel mezzo di coltura. Le attività svolte e i risultati ottenuti sono riportati separatamente per i due sistemi utilizzati.

3.2.1 Caratterizzazione della risposta a condizioni di graduale carenza idrica in diversi genotipi di pomodoro allevati in terreno

Lo schema sperimentale utilizzato per l'imposizione delle condizioni di carenza idrica, riportato in figura 3 ha previsto due cicli di stress interrotti da una fase di recupero così come di seguito indicato :

I ciclo di stress: su un gruppo di piante dopo circa quaranta giorni dalla semina, è stata interrotta l'irrigazione (giorno D0) fin quando i valori di conduttanza stomatica (g_s) non sono drasticamente diminuiti (16° gg dall'interruzione dall'irrigazione, D1);

Fase di Recupero mediante *Rewatering*: dopo 16 giorni d'imposizione dello stress idrico è stata ripresa l'irrigazione delle piante per 7 giorni (RW);

II ciclo di Stress: quando nella fase di *rewatering*, i valori di conduttanza stomatica (g_s) sono ritornati a valori fisiologici pari a quelle delle condizioni di controllo, le piante sono state sottoposte a un successivo ciclo di stress idrico sospendendo nuovamente l'irrigazione per 8-10 giorni (D2).

Lo schema sperimentale su descritto è stato applicato per lo studio di 3 genotipi di pomodoro, la cultivar M82, la linea d'introggressione IL 9.2.5 e l'ecotipo IT025 caratterizzati da differenti indici di tolleranza allo stress da ridotto apporto idrico e selezionati in base ai risultati di cui al paragrafo precedente.

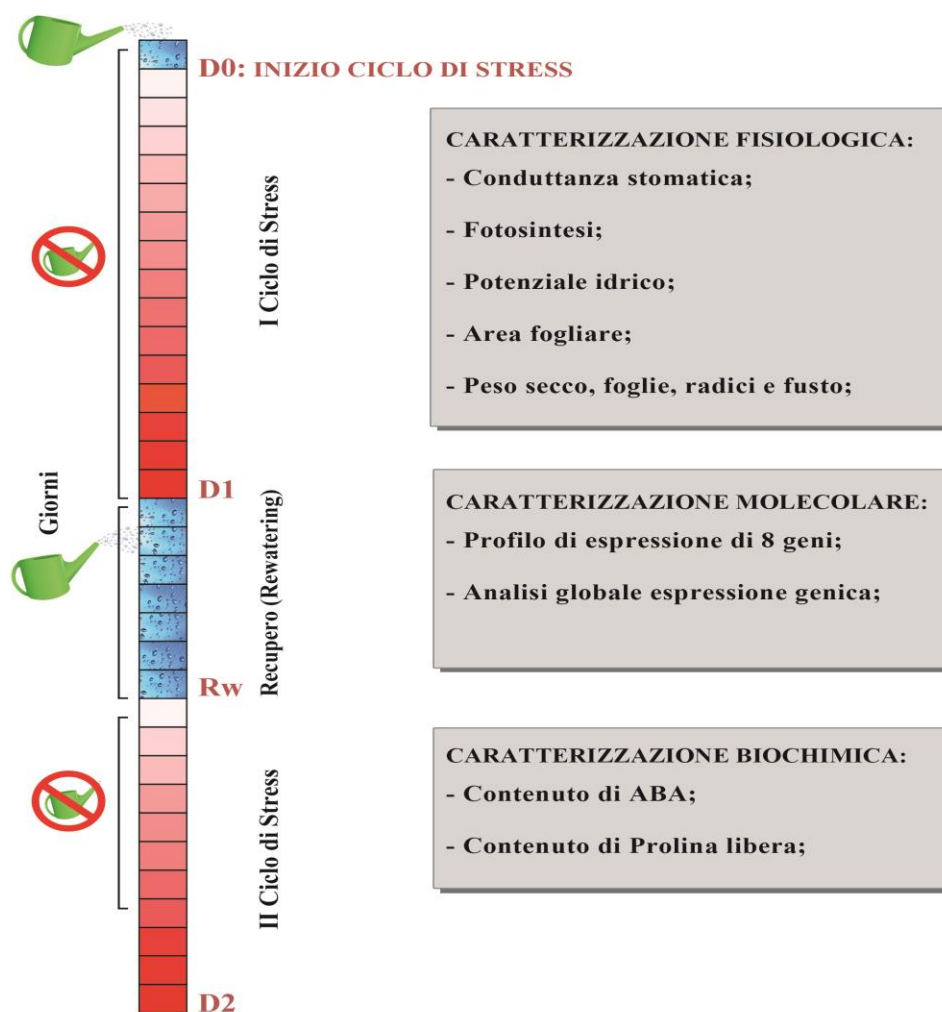


Figura 3. Schema sperimentale utilizzato per lo studio della risposta fisiologica e molecolare di genotipi di pomodoro a stress idrico. Lo schema temporale (in giorni) riporta le fasi di imposizione di un primo e secondo ciclo di stress in cui è stata interrotta l'irrigazione e di un ciclo di recupero (*rewatering*).

Durante la fase sperimentale sono stati valutati alcuni parametri fisiologici e sono stati prelevati campioni per le successive analisi molecolare e biochimiche sia dalle piante sottoposte al ciclo di stress che da piante allevate in condizioni di controllo.

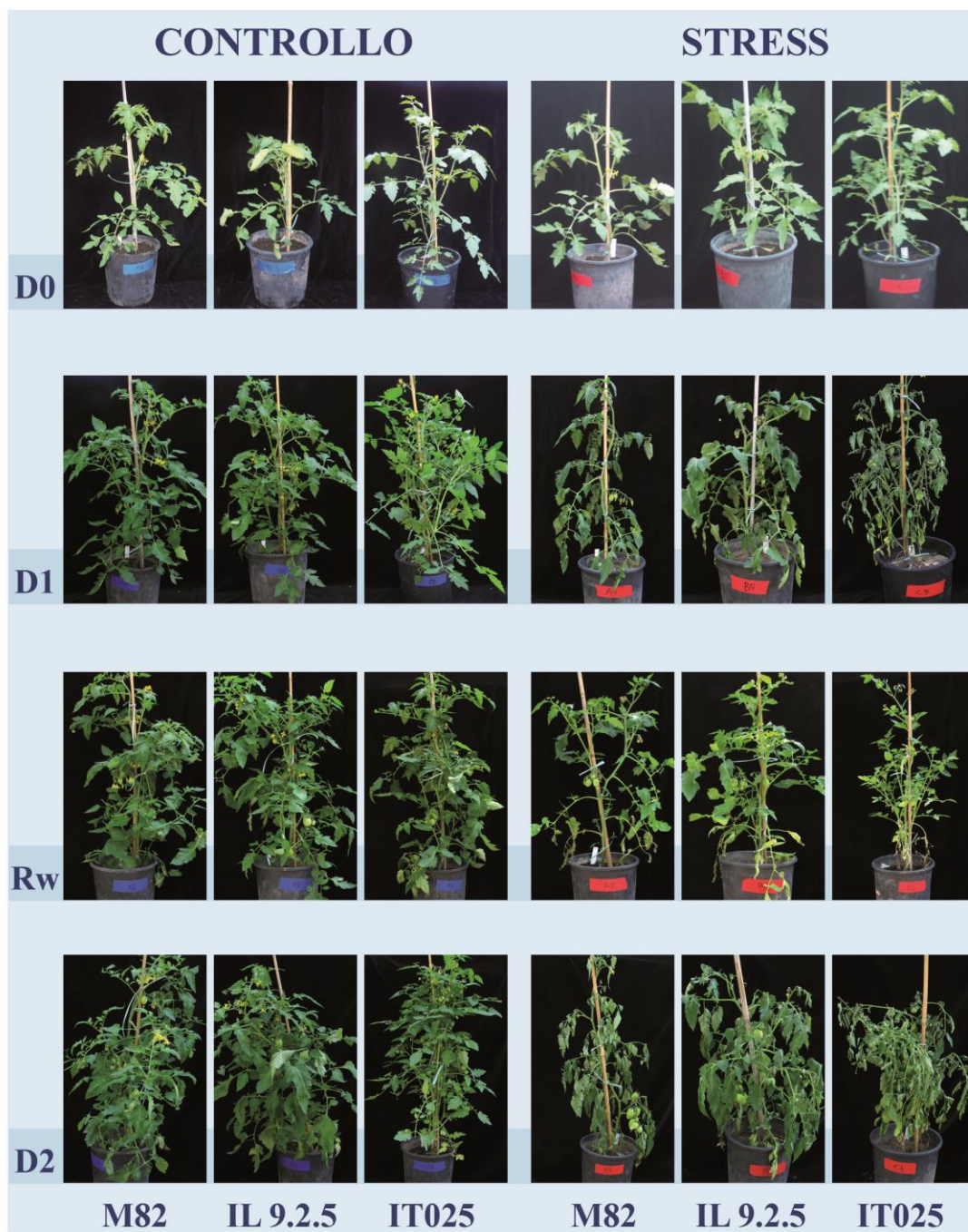


Figura 4. Analisi fenotipica di piante della cultivar M82, della linea d'introgressione IL 9.2.5 e dell'ecotipo IT025 allevate in condizioni controllo e di stress idrico secondo lo schema riportato in fig. 3. Sono riportate le immagini relative ai punti sperimentali D0, D1, RW e D2.

Durante l'allevamento delle piante, il contenuto d'umidità volumetrico d'acqua (Θ) è stato continuamente controllato usando la tecnica della riflettometria nel dominio nel tempo (TDR). Come riportato in figura 5, il contenuto volumetrico d'acqua diminuisce in tutti i genotipi analizzati da circa 0,35-0,40 a 0,10-0,05 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ durante le fasi D1 e D2 dei due cicli di stress idrico mentre rimane costante per le piante controllo. I valori di Θ ritornano a quelli dei vasi di controllo durante la fase di rewatering (RW) (fig. 5).

3.2.1° Caratterizzazione fisiologica

Per ciascun genotipo (M82, IL9.2.5 ed IT025), nelle fasi d'imposizione dello stress e di *recovery* sono stati valutati, in collaborazione con il gruppo di ricerca dei Dr. Giorio e Albrizio dell'istituto CNR-ISAFOM di Ercolano, la conduttanza stomatica (g_s), l'attività fotosintetica (A), il potenziale idrico (Ψ_w) e l'efficienza fotosintetica massima del PSII (F_v/F_m) come parametri fisiologici della risposta alle condizioni di deficit idrico imposte.

Come evidenziato in figura 6 la conduttanza stomatica del vapore acqueo (g_s) risulta significativamente influenzata dallo stato idrico terreno del suolo (fig. 6 A). Nelle piante irrigate regolarmente (controllo), i valori di g_s variano da 0,3 a 0,7 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante il periodo di allevamento mentre nelle piante sottoposte al primo ciclo di stress idrico i valori di g_s si riducono gradualmente fino a 0,02 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dopo 16 giorni (D1), indicando condizioni di severo stress idrico. La cv M82, rispetto ai genotipi IL9.2.5 e IT025, mostra una rapida riduzione dei valori, raggiungendo valori di scambi gassosi molto bassi già dopo 8 giorni dall'interruzione dell'irrigazione. Al termine della fase di *recupero* (7 °gg, RW), si evidenzia che tale parametro fisiologico è pienamente recuperato raggiungendo i valori delle piante e di controllo in tutti i genotipi. Anche le condizioni di carenza idrica imposte dal secondo ciclo di stress (11 ° gg, D2), inducono una completa chiusura stomatica con riduzione degli scambi gassosi in modo simile nei diversi genotipi studiati.

La contemporanea valutazione dell'attività fotosintetica, attraverso (A) evidenzia che durante le diverse fasi di stress-recupero-stress l'assimilazione della CO_2 ha un andamento simile a quello della conduttanza stomatica (fig. 6 B). L'assimilazione di CO_2 si mantiene costante con valori compresi tra 15 e 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nelle piante controllo, mentre diminuisce gradatamente con il progredire della carenza idrica raggiungendo valori minimi (0,5-0,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dopo il primo e secondo ciclo di stress (D1 e D2). In seguito al ripristino dell'irrigazione (*rewatering*) è stato possibile osservare un completo recupero dei parametri dell'assimilazione di CO_2 in tutti i genotipi

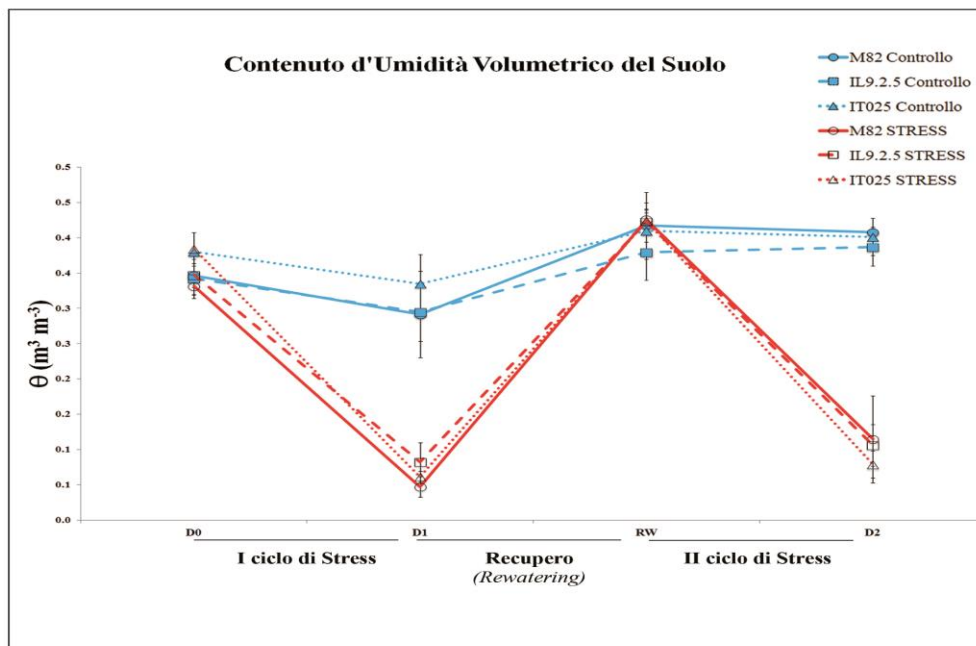


Figura 5. Contenuto d'umidità volumetrico del terreno di tre genotipi di pomodoro analizzati (M82, IL9.2.5 e IT025) mediante l'utilizzo di sonde TDR («Time Domain Reflectometry»).

In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo), in rosso le piante sottoposte stress idrico (Stress) secondo lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig. 3.

analizzati indicando che il macchinario fotosintetico durante lo stress idrico non ha subito danni irreversibili.

Sulle stesse piante utilizzate per le misurazioni di scambi gassosi agli stadi D0, D1, RW e D2 è stata misurata la fluorescenza della clorofilla su foglie pienamente espanse (fig. 7). È stata calcolata la resa quantica massima del fotosistema PSII come rapporto di fluorescenza variabile su fluorescenza massima (F_v/F_m). I valori di F_v/F_m , compresi tra 0,3 e 0,6 in tutti i genotipi, non sono risultati significativamente influenzati dalle condizioni di stress idrico imposte nelle varie fasi di stress/recupero/stress.

Sulle foglie delle piante controllo e di quelle sottoposte al ciclo di stress-recupero stress è stato inoltre valutato il potenziale idrico fogliare totale (Ψ_w) mediante camera a pressione di tipo Scholander (SAPS II). (fig. 8). Nel primo anno di sperimentazione sono stati determinati i valori di Ψ_w all'inizio dell'interruzione dell'irrigazione (D0), al termine del primo ciclo di stress idrico (D1) e al termine del periodo di recupero (RW). Il potenziale idrico fogliare è drasticamente diminuito parallelamente alla riduzione dei valori di conduttanza stomatica (g_s) e di assimilazione fotosintetica idrico fogliare osservate nella fase D1; lo stato idrico della foglia è risultato poi completamente recuperato e confrontabile con quello delle piante controllo al termine della fase di recupero (RW) (dati non mostrati). Sulla base dei risultati su citati nel successivo anno di sperimentazione è stato valutato il potenziale idrico fogliare totale in alcune specifiche fasi per evidenziare eventuali differenze tra i genotipi nelle prime fasi di recupero e nella risposta a un secondo ciclo di stress idrico. I risultati ottenuti (fig. 8) evidenziano che dopo 1 giorno di rewatering i valori di Ψ_w , compresi tra -1,00 e -0,85 MPa, sono ancora significativamente diversi da quelli delle piante controllo e che lo stato idrico fogliare non è completamente recuperato. Inoltre il deficit idrico determina similmente nei genotipi analizzati una riduzione crescente dei valori di Ψ_w all'intensificarsi dell'intensità dello stress idrico dal secondo ed al sesto giorno del secondo ciclo di stress (fig. 8).

Al termine del secondo ciclo di stress idrico, sono stati valutati alcuni parametri biometrici peso secco delle foglie, del fusto, dei frutti e delle radici, lunghezza radici ed area fogliare delle piante dei genotipi M82, IL9.2.5 ed IT025 allevate sia in condizioni controllo che in condizioni di ridotto apporto idrico (tab. 8). In seguito a stress idrico, i parametri valutati si riducono drasticamente in tutti i genotipi analizzati con una riduzione media di circa il 50% rispetto alle piante regolarmente irrigate. In particolare il peso secco delle foglie è ridotto del 32,5 % nei genotipi M82 e IT025, del 48% nella linea d'introggressione IL9.2.5 rispetto alle piante controllo. L'area fogliare dei tre genotipi diminuisce di circa il 30% nei genotipi M82, 32 % in IT025, del 38% nella linea d'introggressione IL9.2.5.

Tabella 8. Parametri Biometrici rilevati nei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 allevati in condizioni controllo e di stress idrico. Le misure sono state effettuate al termine del ciclo di stress idrico.

Controllo			
Genotipo	M82	IL9.2.5	IT025
Peso secco Foglie (g)	14,8 ± 2,5	19 ± 2	12,1 ± 1,3
Peso secco Fusti (g)	14,1 ± 2,6	19,5 ± 0,9	20,35 ± 2,7
Peso secco Frutti (g)	16,3 ± 5	10,2 ± 6,9	21,5 ± 5,3
Peso secco Radici (g)	4 ± 1	3,9 ± 0,14	3,6 ± 0,5
Area Fogliare della Pianta (m ² /m ²)	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,03	0,53 ± 0,07
Medie Lunghezza Radice (cm)	42 ± 2,6	35 ± 6,2	32,7 ± 3,8
Stress Idrico			
Genotipo	M82	IL9.2.5	IT025
Peso secco Foglie (g)	10 ± 1	10,1 ± 1,3	8,2 ± 1
Peso secco Fusti (g)	8,2 ± 1,2	8,6 ± 1,2	11,2 ± 0,8
Peso secco Frutti (g)	9,2 ± 1,4	10,5 ± 2,5	12,2 ± 2
Peso secco Radici (g)	2 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,2
Area Fogliare della Pianta (m ² /m ²)	0,35 ± 0,03	0,41 ± 0,08	0,33 ± 0,07
Medie Lunghezza Radice (cm)	32,3 ± 3,5	28,7 ± 4,7	27,7 ± 1,7

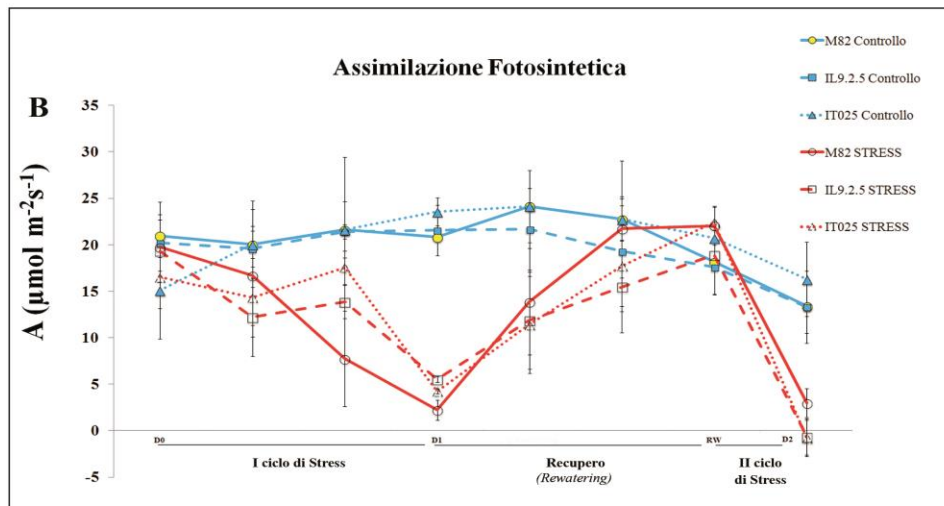
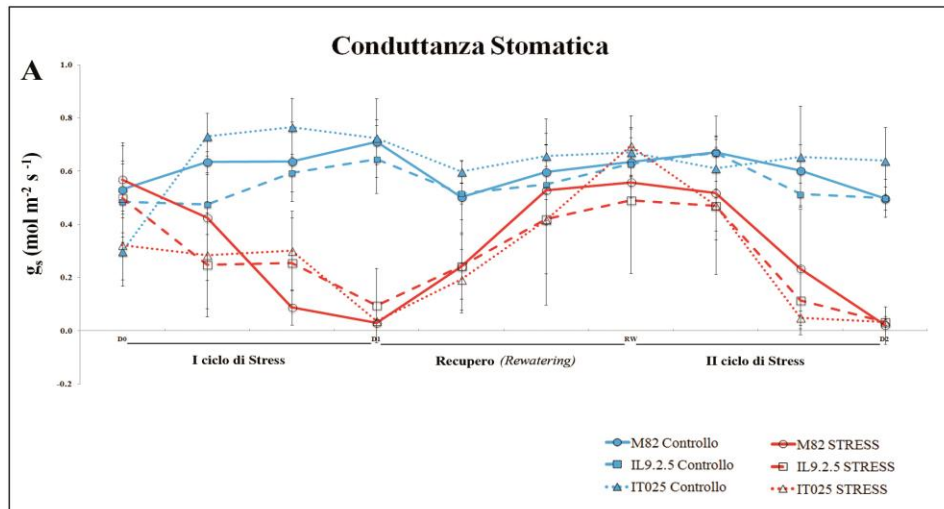


Figura 6. Conduttanza stomatica (A) ed Assimilazione fotosintetica di CO₂ (B) delle foglie dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 durante il periodo di allevamento in condizioni controllo e di stress idrico. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle stressate (Stress) sottoposte a stress imposto lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig. 3.

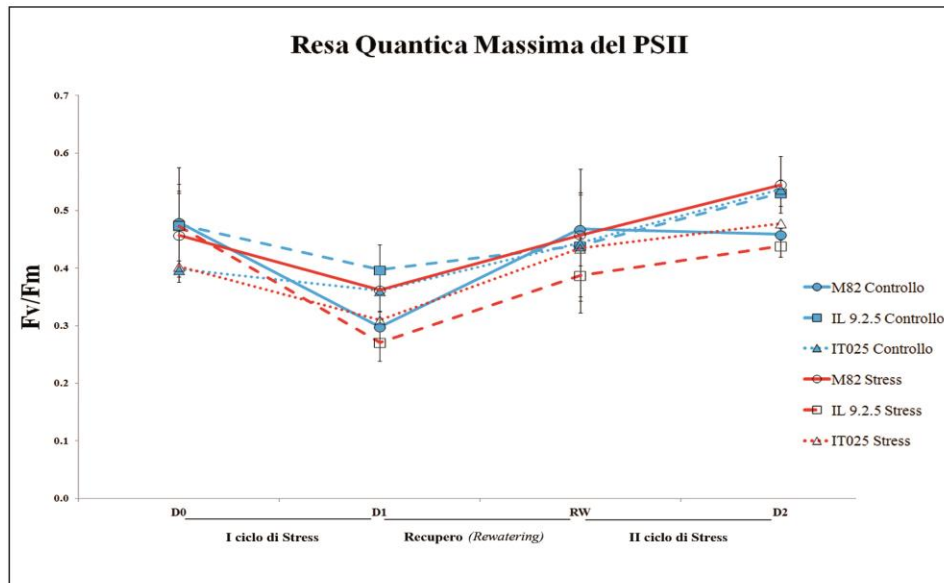


Figura 7. Resa massima del fotosistema PSII (F_v/F_m) delle foglie dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 durante il periodo di allevamento in condizioni controllo e di stress idrico. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle stressate (Stress) sottoposte a stress imposto secondo lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig. 3.

3.2.1b Caratterizzazione molecolare e biochimica

Per studiare i meccanismi molecolari alla base della risposta dei diversi genotipi di pomodoro alle condizioni di stress idrico imposto ed identificare funzioni geniche chiave coinvolte nelle modificazioni fisiologiche descritte e nel ripristino dell'omeostasi cellulare indotte nella fase di recupero da un evento di stress prolungato, è stato effettuato uno studio dettagliato delle modificazione dell'espressione genica.

Al fine di selezionare un set di geni per le analisi di espressione genica mediate qRT-PCR è stato sviluppato quindi un catalogo di geni putativamente coinvolti nella risposta a stress idrico e nei meccanismi di tolleranza mediante ricerca bibliografica e bioinformatica (tab. 9).

I geni identificati comprendono 8 geni noti come "stress responsive" in condizioni di stress idrico e/o osmotico come indicato in letteratura, 2 TC (*Tentative Consensus*) e 3 sequenze ottenute interrogando con le parole "drought stress" e "dehydration" i database disponibili su i siti TIGR (*The Institute of Genomics Research*) e SGN (*Sol Genomics Network*) ed infine 4 geni omologhi ad alcuni geni di patata identificati in colture cellulari sottoposte a stress idrico con 20 % PEG. Ai fini dello studio della risposta dei diversi genotipi di pomodoro alle condizioni di stress idrico imposto e per gli obiettivi su descritti sono stati selezionati dalla lista in tabella 9, 8 geni per le successive analisi.

Tabella 9. Catalogo di geni coinvolti nella risposta/tolleranza allo stress idrico.

CATEGORIA FUNZIONALE	NOME	DESCRIZIONE	GeneBank ID
Geni noti di pomodoro in letteratura			
Proteine di risposta e riparo del danno	TAS 14	<i>TAS 14 dehydrin</i>	X51904
Fattore di trascrizione	DREB1	<i>Dehydration responsive element binding protein 1</i>	AF500011
Trasportatore ionico	LeNHX2	<i>Intracellular NHX exchanger protein family</i>	AJ306631
Proteina del segnale di trasduzione	MKP1	<i>MAP1 kinase phosphatase</i>	AF312747
Proteine di risposta e riparo del danno	NCED1	<i>1-cis-epoxycaratenoid dioxygenase</i>	Z9721
Proteine di risposta e riparo del danno	ACO	<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase</i>	X58273
Proteine di risposta e riparo del danno	P5CS	<i>Pyrroline-5-carboxylate synthetase,</i>	AY897574
Glicosil Transferase	PHOSPH	<i>Starch phosphorylase</i>	SGNU218220
EST ottenute mediante utilizzo di parole chiave nel sito del TIGR e SGN			
Proteine di difesa	LEA	<i>Late embryogenesis abundant protein</i>	SGN-U213276
Proteina di difesa	RD22	<i>Dehydration responsive protein RD22 precursor</i>	TC119796
Proteina di difesa	CDSP32	<i>Chloroplast drought-induced stress protein</i>	SGN-U213598
Geni SOS	SOS1/AF256224	<i>Arabidopsis thaliana Na⁺/H⁺ antiporter</i>	TC131041
Fattore trascrizionale	ERD15	<i>Dehydration induced protein ERD15</i>	TC116286

Per lo studio dell'espressione genica in risposta a stress dei differenti genotipi di pomodoro allevati in serra *in vivo* in condizioni di ridotto apporto idrico secondo lo schema sperimentale già precedentemente descritto (fig. 3), sono stati quindi selezionati i seguenti geni di *Solanum lycopersicum*, codificanti per prodotti genici coinvolti nelle varie fasi di trasduzione del segnale di stress e nei meccanismi di protezione delle strutture cellulari durante gli stress idrici/osmotici :

- *erd15* (*early responsive to dehydration 15*, Kiyosue T. *et al.*, 1994) codificante un fattore trascrizionale, considerato un regolatore negativo della via della trasduzione del segnale dell'ABA e coinvolto nella chiusura degli stomi (Alves *et al.*, 2011);

- *lea* (*Late embryogenesis abundant protein*, SGN-U213276. Gong *et al.*, 2010) codificante una proteina, a funzione non nota, della famiglia delle LEA che sono ampiamente note per essere coinvolte nei meccanismi di tolleranza agli stress idrici e di protezione delle strutture cellulari ma di cui non è ancora ben elucidata la funzione biologica;

- *cdsp32* (*Chloroplast drought-induced Stress Protein of 32kDa*, TC183374) codificante una tiredoxina, coinvolta nella risposta agli stress ossidativi dei cloroplasti;

- *mkp1* (*MAP1 Kinase phosphatase*, XM_004239725.1), codificante una fosfatasi implicata nella via della trasduzione del segnale degli stress osmotici (Nakagami *et al.*, 2005)

- *aco* (*aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase*, X582731) codificante un enzima chiave della biosintesi dell'etilene, e nella conseguente attivazione trascrizione dei geni delle vie non dipendenti da ABA (Sharp *et al.*, 2002);

- *nced* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*, Z97215) codificante una diossigenasi, implicata nella biosintesi dell'acido abscissico, che regola la trascrizione di tutte le vie ABA dipendenti e la chiusura stomatica (Zhang *et al.*, 2009);

- *p5cs* (*pyrroline-5-carboxylate synthetase*, AY897574) codificante una carbossilasi, implicata nella biosintesi della prolina, aminoacido con ruolo di osmolita compatibile con ruolo noto nella osmoprotezione cellulare durante stress idrici e salini (Krasensky *et al.*, 2012);

- *phosph* (*starch phosphorylase*, SGNU218220, una fosforilasi implicata nella regolazione del metabolismo degli zuccheri (Gong *et al.*, 2010).

L'analisi Real-time PCR (qRT-PCR) è stata effettuata su RNA estratti da campioni di foglie di piante allevate e prelevate nelle diverse fasi sperimentali del ciclo stress-recupero-stress scelte in funzione dei valori di conduttanza stomatica (g_s) misurati. In particolare i campioni sono stati

prelevati al termine sia del primo che del secondo ciclo d'interruzione dell'irrigazione quando i valori di g_s sono drasticamente diminuiti (D1 e D2); al completo recupero dell'apertura stomatica ovvero all'ultimo giorno di *rewatering* (RW) in cui i valori di conduttanza stomatica erano pari a quelli delle piante controllo. I livelli d'espressione relativa sono stati determinati rispetto a quelli delle piante controllo prelevate ai tempi D1, RW e D2 ed utilizzate come calibratori. Il gene costitutivo *elongation factor* EF-1 α (X53043) è stato impiegato come gene normalizzatore della reazione qRT-PCR. Per tutti i geni sono stati analizzati due campioni biologici in triplicato per ciascun anno di sperimentazione; nei paragrafi successivi sono riportati i dati di espressione genica ottenuti nel secondo anno di sperimentazione.

All'analisi qRT-PCR, il gene *lea* è risultato fortemente indotto da condizioni di stress idrico che impongono drastici abbassamenti del potenziale idrico e degli scambi gassosi (D1 e D2) in tutti i genotipi analizzati (M82, IL9.2.5 e IT025) e la sua espressione è rapidamente spenta durante il periodo di *rewatering* (RW) (fig. 9 A).

La trascrizione del gene *erd15* è indotta in seguito stress idrico prolungato nei genotipi M82 e IL9.2.5 (fig. 9 B) al termine del primo ciclo di stress idrico (D1) mentre non è attivata durante la fase di recupero o in seguito a un secondo ciclo di stress (RW e D2). I dati qRT-PCR di entrambi gli anni indicano che il fattore trascrizionale *erd15* non sembra essere regolato da condizioni d'inibizione fotosintetica e di chiusura stomatica indotte da carenza idrica nel genotipo tollerante IT025 (fig. 9 B).

Condizioni di deficit idrico prolungate (D1 e D2) risultano influenzare l'espressione del gene *mkp1* codificante una fosfatasi coinvolta nella trasduzione del segnale; i livelli dei trascritti *mkp1* risultano dimezzarsi nei genotipi M82 e IL9.2.5 in fase D1 mentre la trascrizione è riattivata ai livelli delle piante controllo in fase RW e D2. (fig. 10 A). Anche il gene *cdsp32*, codificante una tiredoxina, è risultato regolato da stress idrico, in modo differenziale nei genotipi esaminati, infatti nell'ecotipo IT025 si osserva una induzione in fase di D1, il gene risulta sovraespresso solo in fase D2 nei genotipi M82 e IL9.2.5 (fig. 10 B). Infatti nell'ecotipo IT025 si osserva una induzione in fase di D1, il gene risulta sovraespresso solo in fase D2 nei genotipi M82 e IL9.2.5 (fig. 10 B).

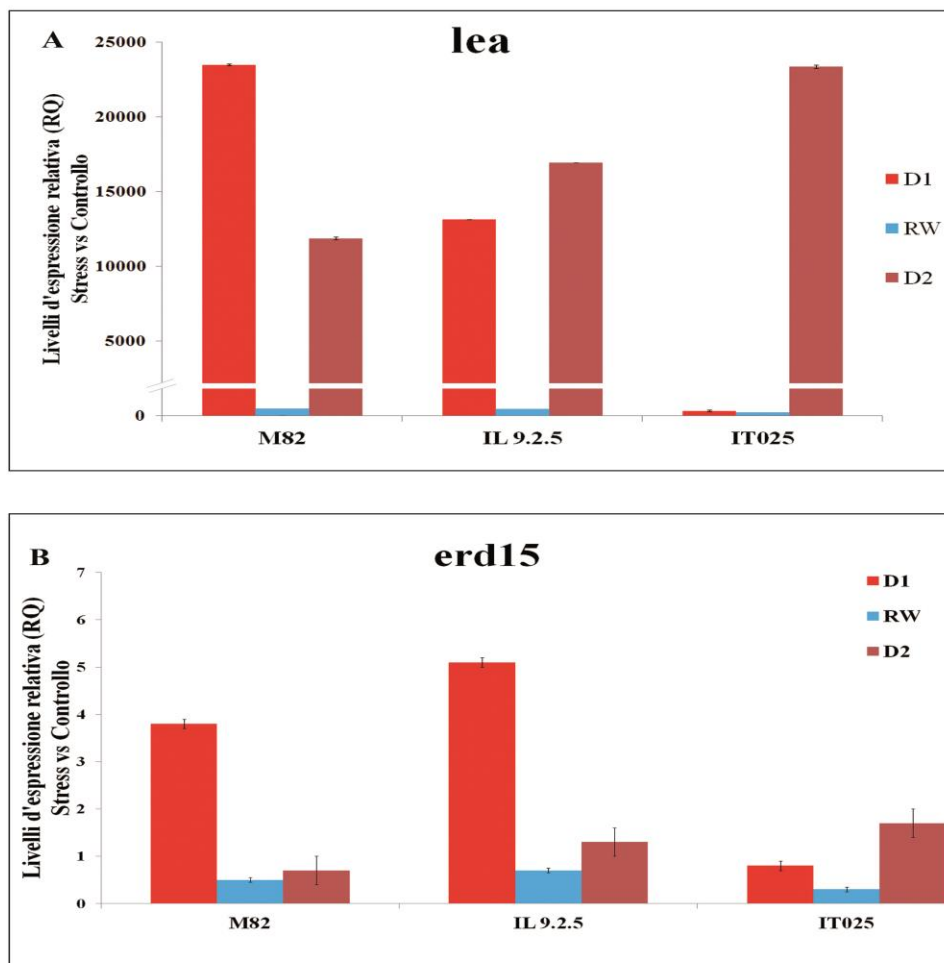


Figura 9. Espressione genica, analizzata mediante qRT-PCR, in foglie di pomodoro nei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto secondo lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig.3.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *lea* (A) ed *erd15* (B) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni di controllo (RQ= 1) e prelevati negli stessi giorni (D1, RW e D2). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

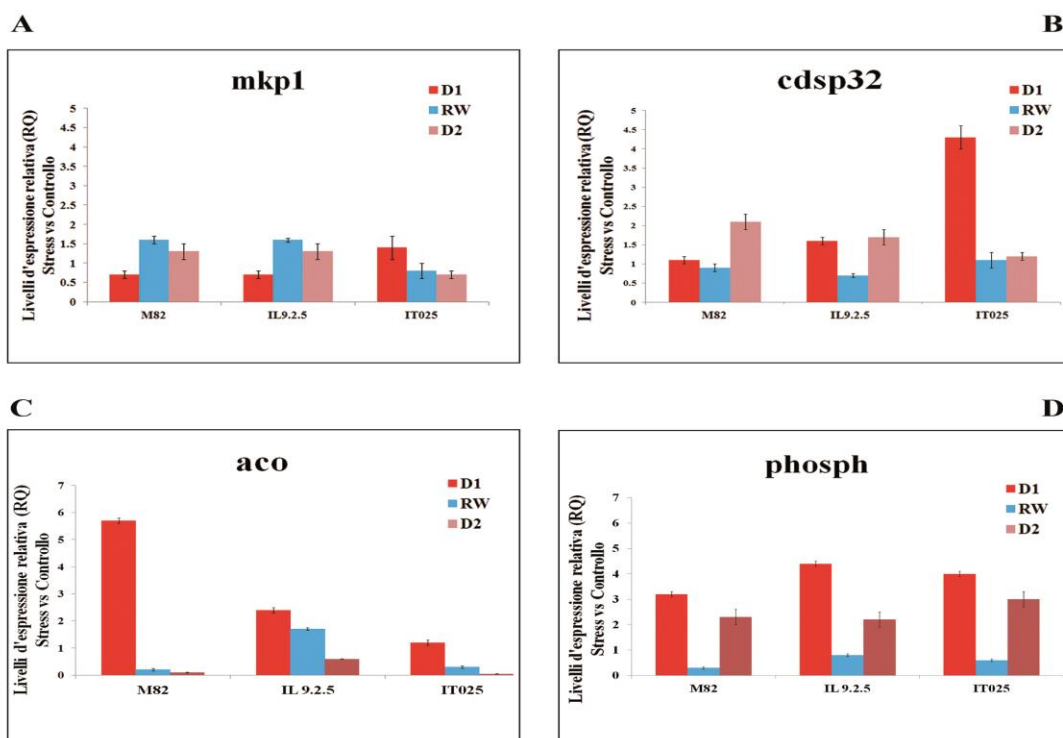


Figura 10. Espressione genica analizzata mediante qRT-PCR in foglie di pomodoro dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico secondo lo schema riportato in fig.3.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *mkp1* (A) *cdsp32* (B), *aco* (C) e *phosph* (D) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1) e prelevati negli stessi giorni (D1, RW e D2). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Le condizioni di stress idrico regolano inoltre la via metabolica della biosintesi dell'etilene. I livelli d'espressione relativa del gene *aco* sono indotti in risposta a bassi valori di conduttanza durante il primo ciclo di stress (D1) in M82 e il IL9.2.5 ma non nell'ecotipo tollerante IT025 (fig. 10 C). D'interesse è che il gene non risulta differenzialmente espresso dal successivo ciclo di stress idrico (D2).

Inoltre, un significativo incremento relativo dei trascritti del gene *phosph* è stato rilevato in tutti i genotipi analizzati e al termine delle fasi d'imposizioni dello stress idrico (D1 e D2), (fig. 10 D), questo è in accordo con il ruolo cruciale del metabolismo degli zuccheri nella risposta fisiologica a condizioni di stress idrico.

La risposta a condizioni di ridotto apporto idrico è notoriamente caratterizzata anche dalla regolazione di due importanti vie metaboliche relative alla biosintesi della prolina e dell'acido abscissico, sono stati quindi inoltre monitorati i livelli d'espressione relativa dei geni *p5cs* e *nced*, coinvolti nelle loro vie biosintetiche.

In risposta a graduali e crescenti condizioni di stress da carenza idrica, con conseguente chiusura stomatica ed inibizione dell'attività fotosintetica, è stata osservata la regolazione del gene *p5cs* codificante l'enzima chiave della biosintesi della prolina (fig. 11). I livelli trascrizionali di tale gene aumentano di 2 volte e di 5 volte rispetto ai valori del controllo nelle linee M82 e IT025 e nell'ecotipo IT025 rispettivamente. I trascritti di *p5cs* non sono accumulati né in fase di recupero né al termine del secondo ciclo (D2) in tutti i genotipi analizzati. La regolazione dell'espressione del gene *p5cs*, così come rilevato mediante qRT-PCR, è risultata inoltre correlata ai livelli di prolina libera delle foglie di piante sottoposte al ciclo di stress-recupero-stress (fig. 12 A, B e C). Infatti il contenuto di prolina aumenta all'intensificarsi delle condizioni di stress imposte fino a 20 volte rispetto ai valori del controllo e si riduce durante la fase di recupero in tutti i genotipi. In risposta all'imposizione di un secondo ciclo di stress si evidenzia un comportamento differenziale dei 3 genotipi, in M82 e nella linea IL9.2.5 i livelli di prolina restano elevati e costanti (4 nmoli/g e 6 nmoli/g di peso fresco, rispettivamente) (fig. 12 A e B) mentre nella linea tollerante IT025 si riducono verso i livelli basali del controllo (fig. 12 C).

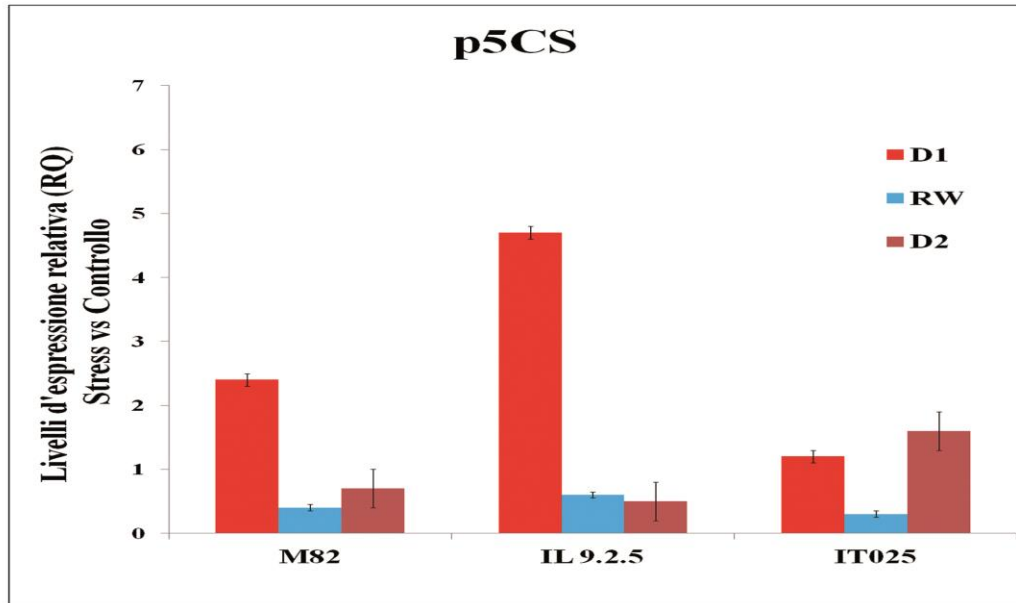


Figura 11. Espressione genica analizzata mediante qRT-PCR in foglie di pomodoro del gene *p5cs* dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico secondo lo schema riportato in fig.3.

I livelli d'espressione relativa (RQ) sono stati determinati, rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ=1) e prelevati negli stessi giorni (D1, RW e D2). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

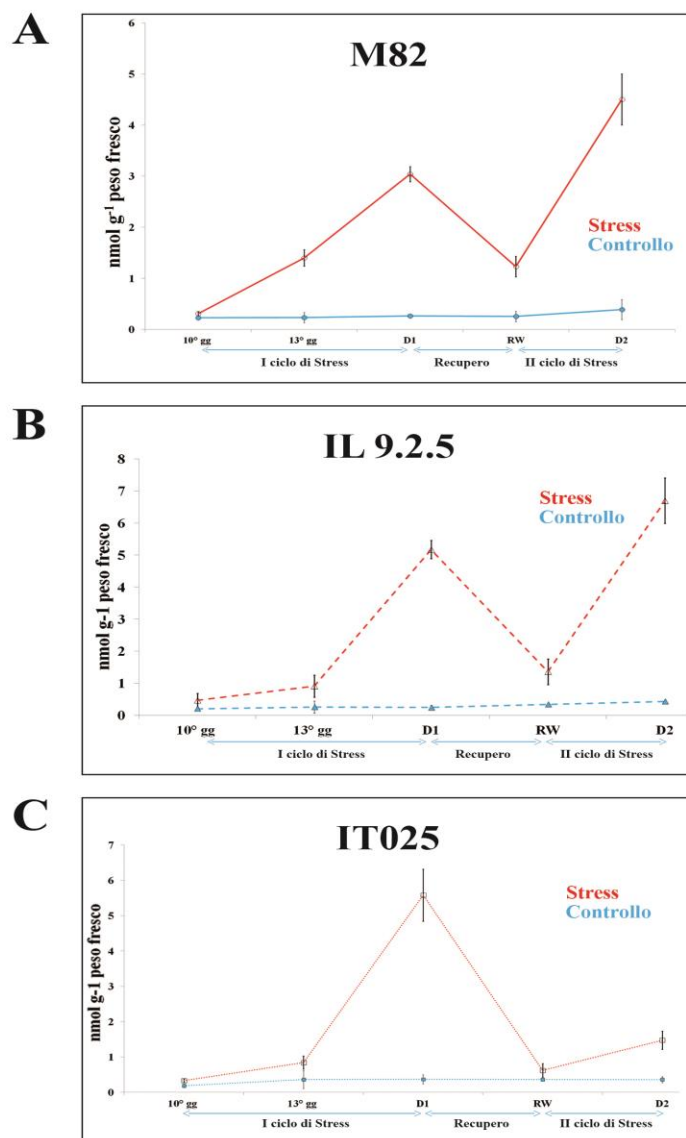


Figura 12. Contenuto di Prolina libera nella linea M82 (A), nella linea d'introgressione IL9.2.5 (B) e in IT025 (C) durante il ciclo di stress-recupero stress.

In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle stressate (Stress) sottoposte a stress imposto secondo lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig 3.

Come atteso condizioni di prolungato stress idrico che determinano nelle piante di pomodoro valori di conduttanza stomatica e di assimilazione fotosintetica drasticamente ridotti (D1 e D2) inducono fortemente l'espressione di *nced* (fig. 13 A). Da notare sono gli elevati di livelli di espressione relativa riscontrati in D2 nei genotipi IL9.2.5 e IT025 rispetto alla fase D1.

Mediante saggio indiretto ELISA sono stati determinati i livelli di ABA in foglie dei genotipi di pomodoro allevati in vaso (fig. 13 B). Il contenuto di acido abscissico fogliare incrementa solo per il genotipo tollerante allo stress idrico, IT025, dopo 10 giorni d'imposizione del deficit idrico, quando i valori di conduttanza stomatica si sono dimezzati (da 0,8 a 0,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Mentre non sono state rilevate variazioni per gli altri due genotipi in esame. Elevati livelli di ABA si accumulano a dopo 16 giorni di stress idrico (D1) quando è stata osservato un forte accumulo dei messaggeri di *nced*, di ABA per i genotipi M82 e IT025. In D1 la concentrazione di acido abscissico è pari a 4921,3 e 6246 pmoli g^{-1} e 2448,50 pmoli g^{-1} per i genotipi M82, IT025 e IL9.2.5 (fig 13 B). Al termine della fase di recupero tramite *rewatering*, quando i parametri fisiologici sono completamente recuperati, i livelli dell'acido abscissico sono di nuovo confrontabili con quelli delle piante controllo. Questo risultato è in accordo con quelli dell'analisi dell'espressione del gene *nced*. Il contenuto in ABA incrementa inoltre durante il secondo ciclo di stress per i genotipi IT025 e IL9.2.5 mentre non è stato osservato nessun accumulo di tale metabolita nella cv M82.

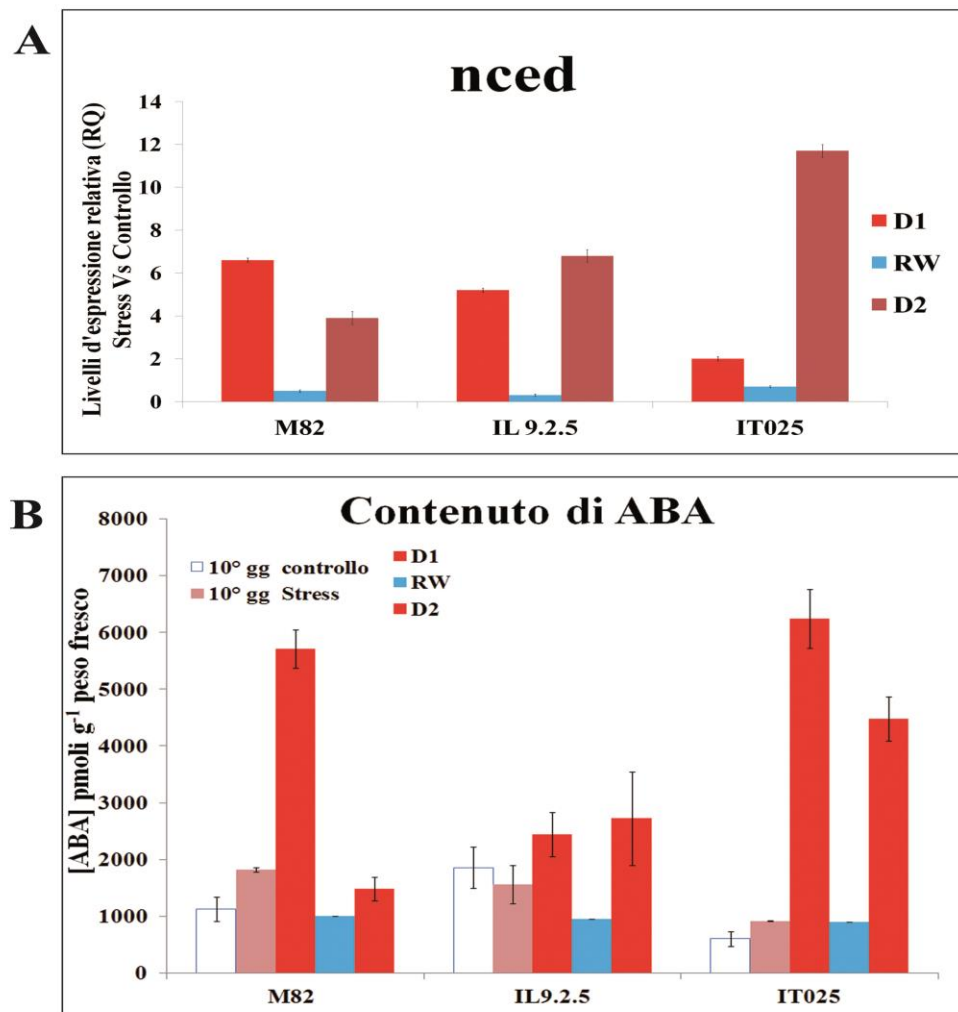


Figura 13. Espressione del gene *nced* (A) e contenuto di ABA (B), in foglie di pomodoro dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 allevati in condizioni controllo e di stress idrico secondo lo schema riportato in fig.3.

(A) In seguito a qRT-PCR, i livelli d'espressione relativa (RQ) sono stati determinati, rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ=1) e prelevati negli stessi giorni (D1, RW e D2). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

(B) Contenuto di ABA, determinato mediante test ELISA, in foglie di pomodoro prelevate in diverse fasi del ciclo di stress-recupero-stress. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle stressate (Stress) sottoposte a stress imposto secondo lo schema e le fasi sperimentali riportate in fig. 3.

3.2.2 Caratterizzazione della risposta a stress idrico imposto da PolyEtilenGlicole (PEG)

Sono state messe a punto le condizioni sperimentali di allevamento di diversi genotipi di pomodoro (piante della cultivar M82 e della linea d'introggressione IL9.2.5) fuori suolo, in coltura idroponica, in condizioni controllo e di carenza idrica allo scopo di studiare i meccanismi fisiologici e molecolari di risposta delle piante a condizioni di stress idrico di media alta intensità ma di breve durata. Lo stress idrico è stato imposto secondo lo schema riportato in figura 15, aggiungendo PEG 8000 alle concentrazioni del 7,5% e del 15% PEG alla soluzione nutritiva, su piantine di circa tre settimane allevate in celle climatizzate (fig. 14). Dopo un trattamento con PEG al 7,5% per 24 h, le piante sono state trasferite in un substrato con PEG al 15% per le successive 72 h. Sui genotipi sottoposti a stress e in quelli allevati in condizioni controllo, sono stati effettuati dei prelievi di campioni di foglie e radici per le analisi molecolari e biochimiche. In collaborazione con il gruppo di ricerca dei Dr. Giorio e Albrizio del CNR-ISAFOM di Ercolano sono stati valutati alcuni parametri fisiologici a 48 h e a 72 h dal trattamento con PEG al 15 %.

3.2.2a Caratterizzazione fisiologica

Sulle piante di M82 e IL9.2.5 sottoposte a un stress di 48 h e 72 h mediato da PEG 15% dopo un iniziale trattamento con PEG al 7,5 % sono stati misurati gli scambi gassosi e la assimilazione fotosintetica. La conduttanza stomatica (g_s) delle piante della cultivar M82 così come quella della linea d'introggressione IL9.2.5 è risultata drasticamente ridotta già dopo 48 h di trattamento al 15% PEG rispetto alle piante controllo, da circa $0,5 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ per le piante controllo a $0,03 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (fig. 15 A). Lo stress idrico mediato da PEG al 15% ha determinato inoltre l'inibizione dell'assimilazione fotosintetica della CO_2 i cui valori di (A), sono ridotti ai a 2,6 e $1,7 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ per M82 e per IL9.2.5 rispettivamente (fig. 15 B). Inoltre, è stata valutata l'efficienza fotosintetica massima del PSII monitorando il rapporto Fv/Fm. Tutti i valori Fv/Fm sono ottimali non evidenziando significative differenze tra le piante controllo e le piante sottoposte a 48 h e a 72 h di stress idrico per entrambi i genotipi analizzati (fig. 15 C). I valori dell'efficienza massima del PSII indicano che le condizioni di stress idrico raggiunte dall'aggiunta di PEG nel mezzo di coltura, benché severe, non hanno causato danni irreversibili al sistema fotosistemico II.

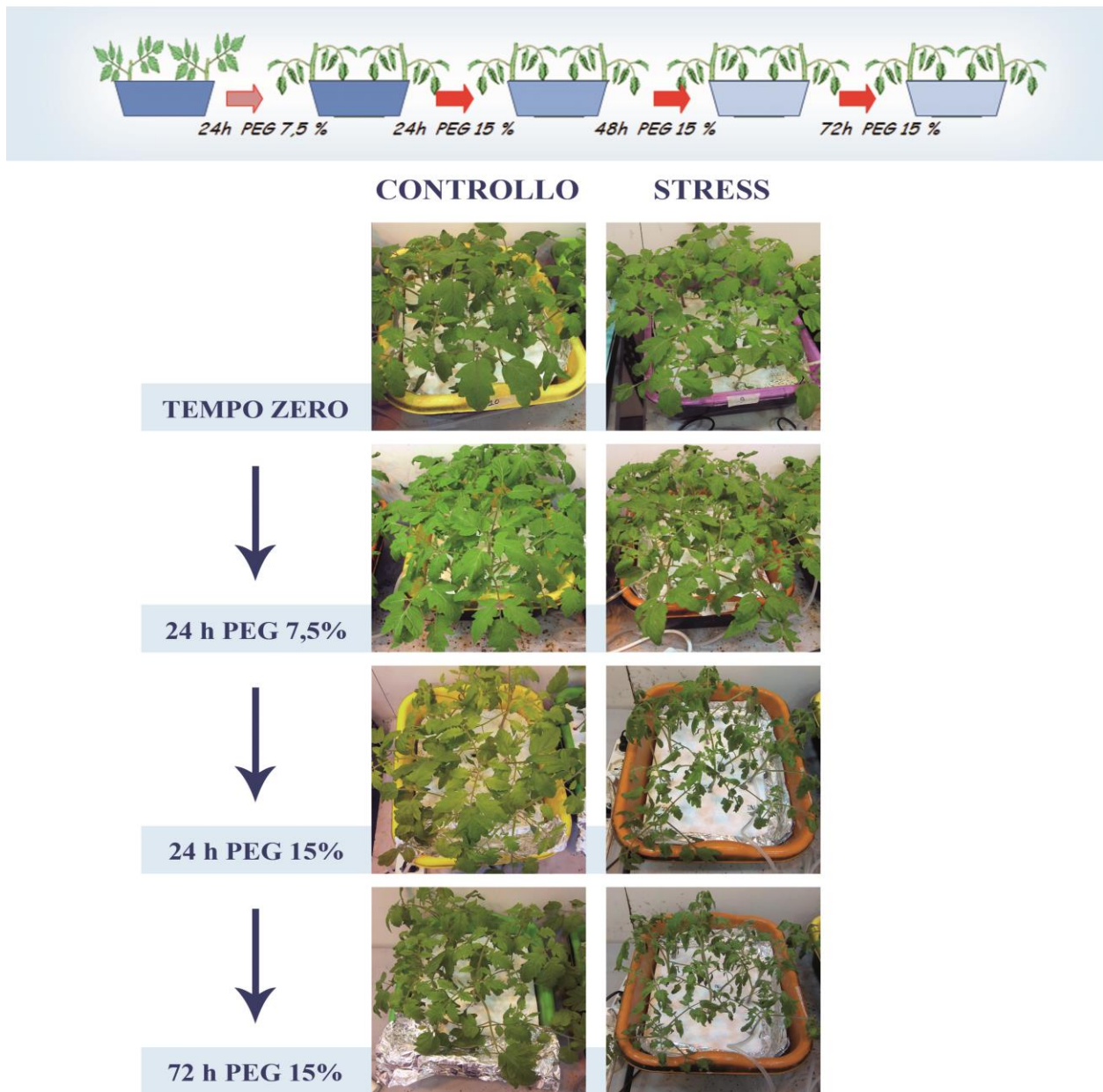


Figura 14. Schema sperimentale per l'imposizione dello stress idrico cultura idroponica in piante dei genotipi M82, IL9.2.5. Le piante sono state allevate per 20 giorni e lo stress idrico è stato imposto aggiungendo PEG 8000 (7,5%) alla soluzione nutritiva. Dopo 24 h, le piante sono state trasferite in una soluzione al 15% PEG per le successive 72 h. Durante il ciclo sono state effettuate misurazioni di alcuni parametri fisiologici e effettuati prelievi per le analisi molecolari.

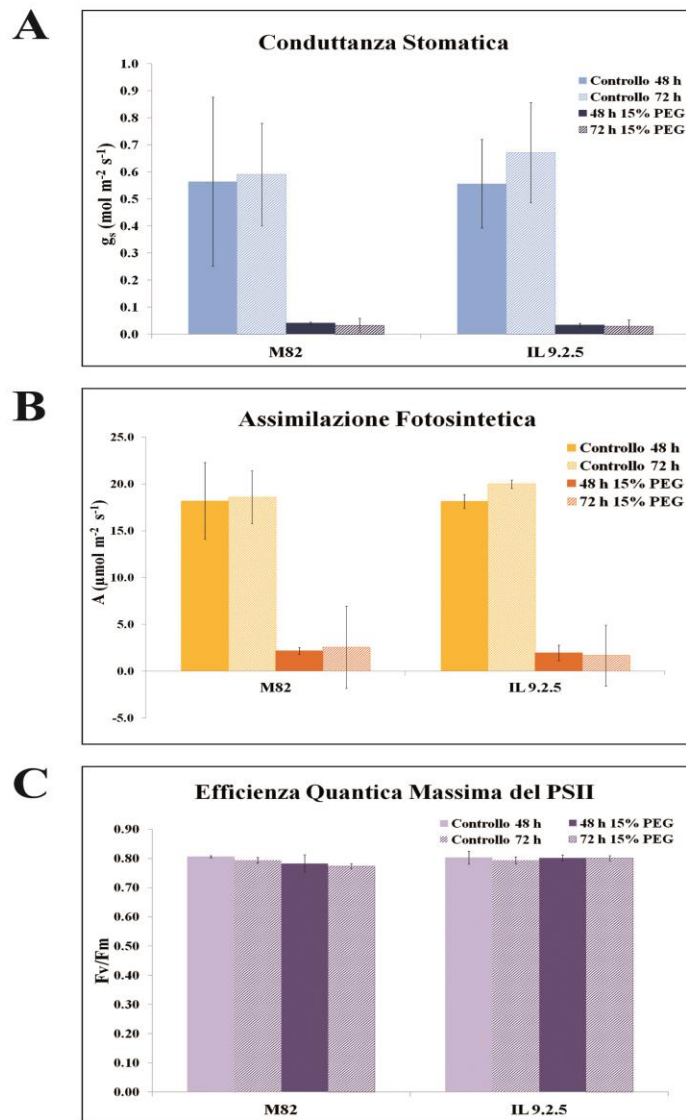


Figura 15. Conduttanza stomatica (A), Assimilazione fotosintetica del CO₂ (B) e resa quantica massima del PSII (F_v/F_m) (C) delle foglie dei genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 durante il periodo di allevamento in condizioni controllo e di stress idrico imposte da PEG, secondo lo schema riportato in fig. 14.

3.2.2b Caratterizzazione molecolare e biochimica

Per studiare i meccanismi molecolari della risposta dei diversi genotipi di pomodoro alle condizioni di stress idrico imposto e correlare queste modificazioni fisiologiche descritte, è stato valutato quindi il profilo di espressione genica in foglie e radici di piante allevate in coltura idroponica, mediante analisi qRT-PCR. Sono stati utilizzati a tal scopo alcuni dei geni riportati nella tabella 9 e negli esperimenti riportati al paragrafo 3.2.1b. In particolare è stata monitorata l'espressione di geni che codificano per enzimi coinvolti in importanti vie metaboliche come quella dell'ABA (*nced*, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase), dell'etilene (*aco*, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase) e della prolina (*p5cs*, pyrroline-5-carboxylate synthetase); per proteine note per essere associate allo stress osmotico ed essere regolatori negativi della via della trasduzione del segnale dell'ABA (*erd15*, early responsive to dehydration); di geni coinvolti nella trasduzione e nella percezione del segnale (*mcp1*, MAP1 Kinase phosphatase); di geni coinvolti nella degradazione degli zuccheri e il metabolismo energetico (*phosph*, starch phosphorylase); di un gene appartenenti a famiglie geniche che codificano per proteine implicate nella tolleranza allo stress idrico (*lea*, Late embryogenesis abundant protein), per un proteina coinvolta nella risposta allo stress idrico in patata e in Arabidopsis (*RGGA*, RNA binding protein).

Come atteso, le analisi qRT-PCR confermano che il gene *lea* è coinvolto nella risposta a condizioni di stress particolarmente intense (fig. 16 A). In coltura idroponica, quando gli stomi sono completamente chiusi e l'assimilazione dell'anidride carbonica è fortemente ridotta (48 h e 72 h 15 % PEG) si ha un notevole incremento dei livelli di espressione di tale gene nelle foglie (fig. 16 A). Invece dai risultati qRT-PCR, il gene *rgga* codificante una RNA Binding Protein e noto per il coinvolgimento nello stress idrico in patata (Ambrosone *et al.*, 2009), non è risultato regolato a livello trascrizionale in foglie di pomodoro (fig. 16 B).

La risposta di pomodoro allo stress idrico implica la regolazione trascrizionale di geni che codificano per fattori trascrizionali e per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. A questo scopo sono state analizzati i livelli d'espressione del gene *erd15* e *mcp1* (fig. 17 A e B). Entrambi i geni sono fortemente regolati in condizioni severe di stress idrico mediate da PEG al 15% (24 h) nelle foglie dei genotipi analizzati. Il gene *mcp1* mostra un profilo peculiare di espressione, con un rapido aumento dei trascritti già nelle prime fasi di stress, particolarmente nel genotipo M82.

Nelle foglie di entrambi i genotipi analizzati, l'analisi qRT-PCR ha evidenziato un incremento dei trascritti del gene che codifica per una fosforilasi dell'amido (*phosph*) dopo 24 h e 72 h di stress idrico mediato da PEG al 15 %, confermando che il metabolismo degli zuccheri è fortemente regolato in condizioni di stress idrico (fig. 17 C). Inoltre è stato evidenziato un profilo

d'espressione genotipo-specifico per il gene *aco*. Nel genotipo IL9.2.5 in risposta alle condizioni di stress non è stata osservata una significativa induzione della trascrizione. Nel genotipo sensibile M82 invece, si evidenzia che già nella fase di acclimatamento allo stress idrico (24 h 7,5 % PEG) il gene *aco* importante regolatore della via metabolica della biosintesi dell'etilene, è indotto ad elevati livelli (fig. 17 D).

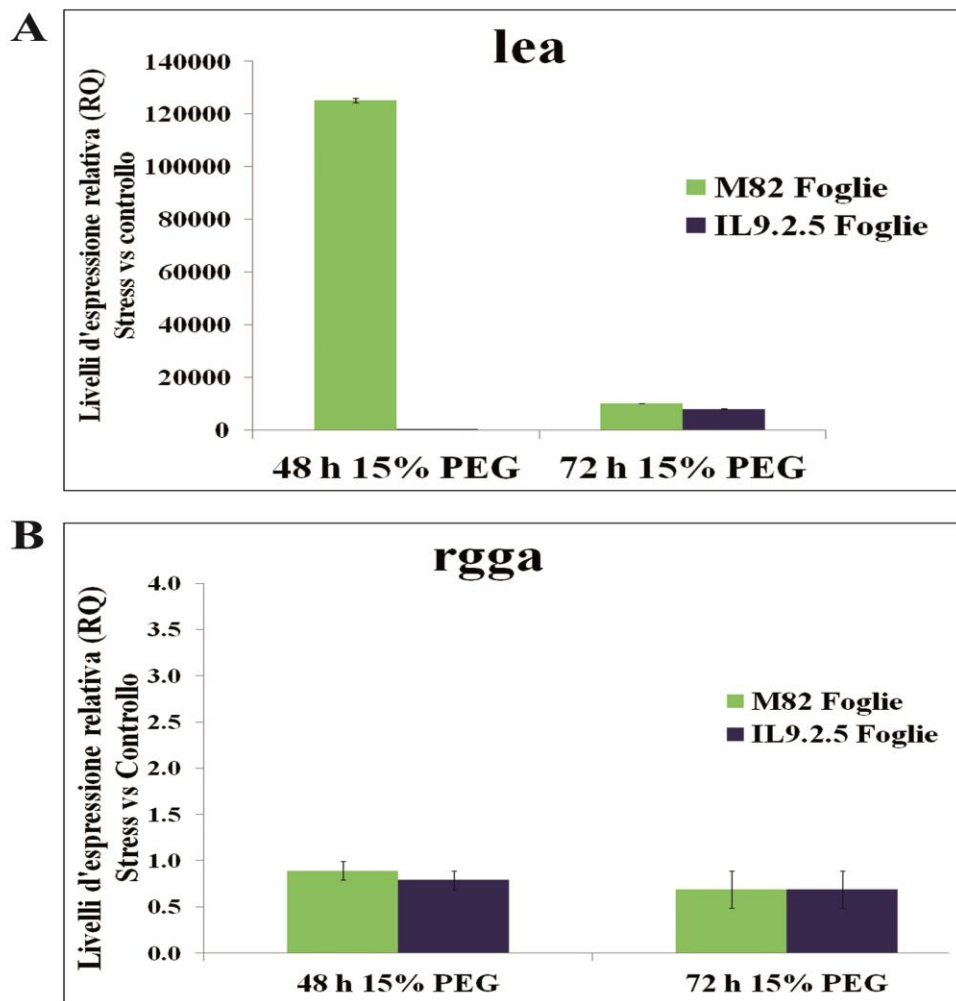


Figura 16. Espressione genica, analizzata mediante qRT-PCR, in foglie di pomodoro nei genotipi M82 e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.15.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *lea* (A) e *rgga* (B) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

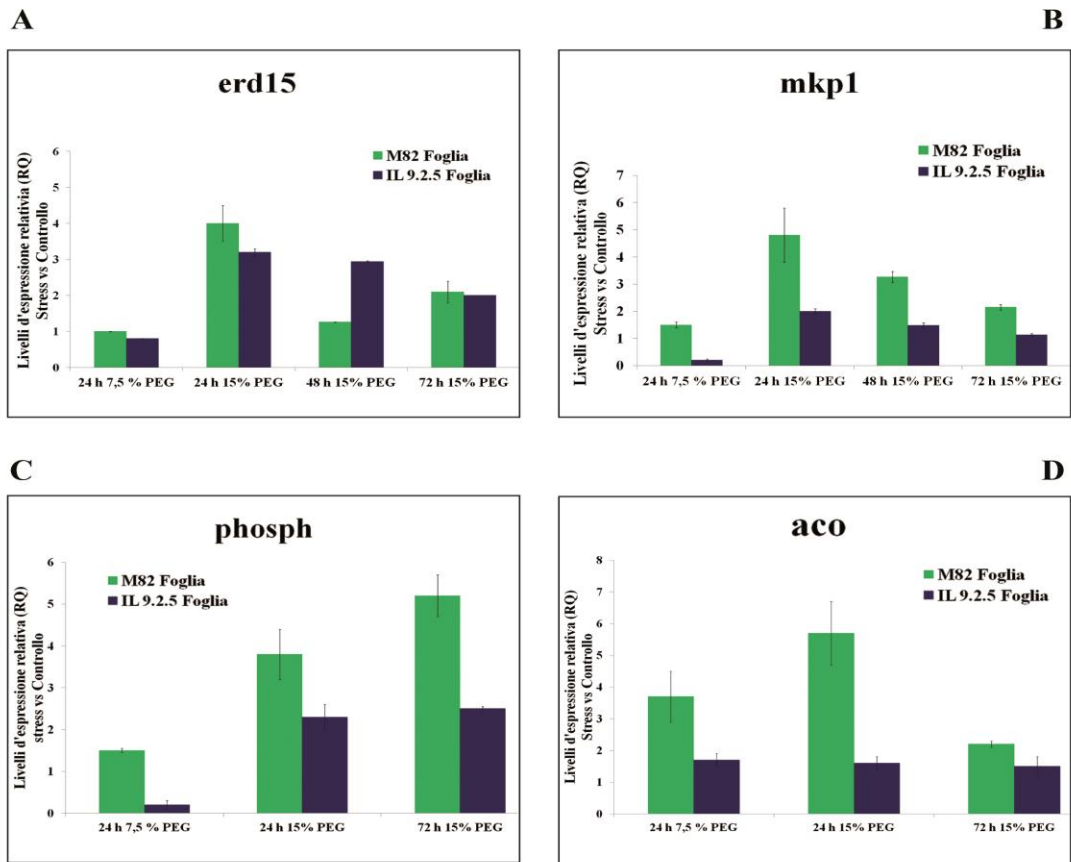


Figura 17. Espressione genica, analizzata mediante qRT-PCR ,in foglie di pomodoro nei genotipi M82 e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.14.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *erd15* (A) , *mkp1* (B) *phosph* (C) e *aco* (D) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Come evidenziato in figura 18, le condizioni di stress idrico nel genotipo sensibile M82 inducono un rapido e forte accumulo dei trascritti del gene *nced* nelle prime 24 h di stress idrico mediato da PEG al 7,5 %, i messaggeri di questo gene incrementano di 47 volte rispetto ai valori di espressione relativa del controllo all'aumentare dell'intensità dello stress (24 h 15% PEG) e restano simili a elevati anche se ridotti dopo 72 h di stress mediato da PEG al 15 % (fig. 18 A). Un profilo simile, anche se con livelli di espressione relativa meno elevati si osserva nella linea IL9.2.5. Campioni di foglie di entrambi i genotipi, sono stati prelevati in diverse fasi sperimentali d'imposizione dello stress idrico e sono stati caratterizzati per il contenuto di acido abscissico (fig. 18 B). Nella fase di acclimatamento allo stress idrico, 24 h 7,5 % PEG, è stato rilevato un modesto incremento di ABA di circa 1,5 volte rispetto ai livelli presenti nelle piante allevate in condizioni controllo. In corrispondenza dei elevati livelli del messaggero di *nced* a 24 h 15% PEG, è stato riscontrato un notevole incremento di ABA che raggiunge concentrazioni pari a 21947,7 e a 14000,2 pmoli g⁻¹ di peso fresco rispettivamente per il genotipo M82 e IL9.2.5.

E' stato inoltre verificato il coinvolgimento nei meccanismi di risposta allo stress imposto di vie metaboliche di sintesi di importanti soluti compatibili quali la prolina. L'analisi qRT-PCR ha evidenziato un incremento relativo del gene *p5cs* (24 h e 72 h 15% PEG) che catalizza il primo passaggio della conversione del glutammato in prolina, suggerendo un possibile aumento della produzione di prolina nelle foglie di pomodoro. In entrambi i genotipi analizzati i messaggeri *p5cs* sono incrementati di circa 4 volte e di 2 volte dopo 24 h e 72 h di trattamento con 15 % PEG, rispettivamente (fig. 19 A).

Foglie di piante di *Solanum lycopersicum* allevate in coltura idroponica e sottoposte a stress idrico da PEG sono state prelevate per determinare i livelli di prolina libera (fig. 19 B e C). In condizioni controllo non sono state osservate differenze significative delle quantità di prolina accumulata nei due genotipi analizzati. Lo stress idrico mediato da PEG al 7,5% non determina un accumulo di tale osmolita, in accordo con i dati di qRT-PCR. Dopo 24 h di stress idrico mediato da PEG al 15 % si è osservato un incremento di 5 volte dei livelli di prolina libera nelle foglie di entrambi i genotipi analizzati. Dopo 72 h di stress idrico i livelli di prolina aumentano di circa 10 volte rispetto alle piante controllo, mentre a livello trascrizionale i messaggeri di *p5cs* non sono più accumulati (fig. 19 B e C).

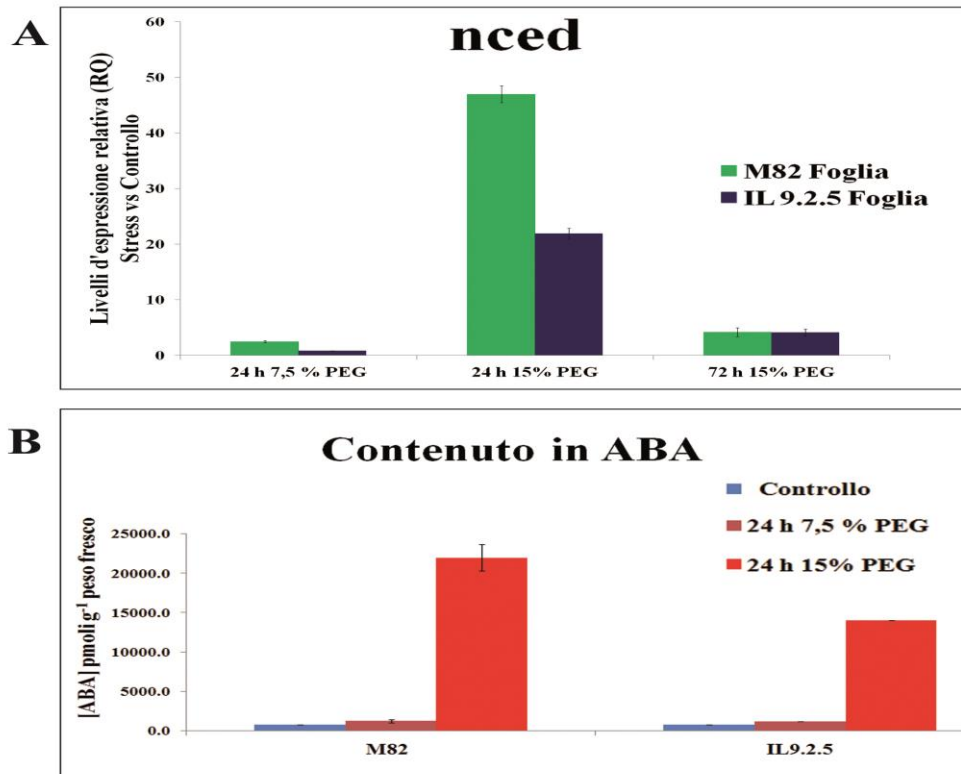


Figura 18. Espressione, del gene *nced* (A) e contenuto in ABA (B) in foglie genotipi M2, e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.12.

(A) In seguito a qRT-PCR i livelli d'espressione relativa (RQ) sono stati determinati, rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato

(B) Contenuto di ABA in foglie di pomodoro determinato mediante test ELISA. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle sottoposte a stress idrico (PEG).

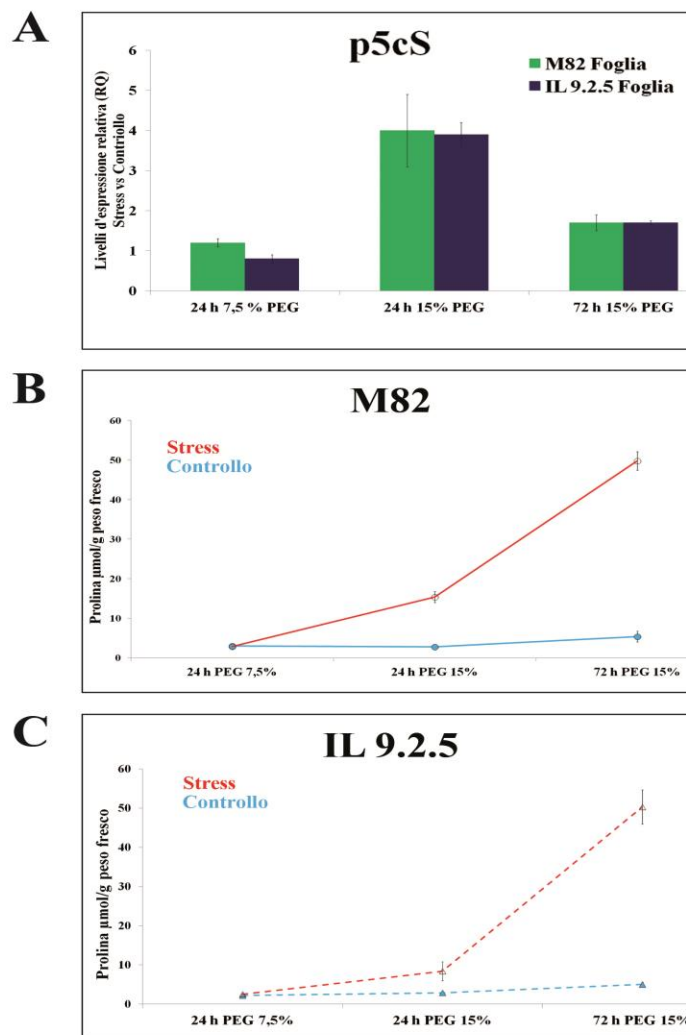


Figura 19. Espressione in foglie di pomodoro del gene *p5cs* (A) e contenuto di prolina libera (B e C), nei genotipi M82, e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.12.

(A) In seguito a qRT-PCR i livelli d'espressione relativa (RQ) sono stati determinati, rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

(B) Contenuto di prolina libera in foglie di pomodoro. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle sottoposte a stress idrico (Stress).

Il sistema sperimentale fuori suolo è stato utilizzato per studiare i profili di espressione dei geni oggetto di studio anche nella radice delle piante sottoposte a stress, dato l'interesse di tale tessuto che è sede primaria della percezione del segnale di stress idrico. Il gene *lea* viene fortemente accumulato nelle radici delle piante della linea d'introggressione IL9.2.5 a 48 h di stress idrico (fig. 20 A), infatti l'analisi qRT-PCR ha evidenziato un incremento relativo di circa 500 in radice mentre nel tessuto foglia soltanto di circa 2 volte. Nel genotipo M82, le condizioni di stress idrico imposte dall'aggiunta di PEG alla soluzione nutritiva, determinano un accumulo del trascritto nelle prime 48 h di stress idrico inferiore alla linea d'introggressione (livelli d'espressione relativa pari a 10). All'intensificarsi dello stress idrico in tale cultivar è stato osservato un ulteriore incremento di 5 volte dei trascritti del gene *lea*. I risultati qRT-PCR confermano che anche nelle radici dei due genotipi analizzati la trascrizione del gene *rgga* non viene indotta da condizioni drastiche di stress idrico imposte da PEG 15%. (fig. 20 B).

Anche nella radice, la risposta allo stress idrico è caratterizzata dalla regolazione di geni coinvolti nella percezione nella regolazione trascrizionale come *erd15* e nella trasduzione del segnale come *mkp1*. L'induzione trascrizionale di *erd15* è stata osservata dopo 24 h e 72 h 15% PEG in entrambi i genotipi analizzati (fig. 21 A). Nella cultivar M82 si osserva un'immediata regolazione della via del segnale mediata dalla fosfatasi *mkp1* che mostra valori di espressione relativa RQ pari a 2,5 dopo 24 h PEG 7,5% (fig. 21 B). L'analisi qRT-PCR non ha evidenziato un accumulo dei trascritti del gene *phosph*, nelle radici di piante in risposta condizioni di stress idrico (fig. 21 C). Il gene *aco* nelle radici mostra un profilo di induzione simile a quello osservato nelle foglie. Elevati livelli di trascritti relativi al gene *aco* si osservano nella linea d'introggressione IL9.2.5 (RQ pari a 18,1) in condizioni severe di stress idrico mediato da PEG 15 %, condizioni che inducono anche se non in modo drastico (RQ= 2,2) il gene in M82, genotipo in cui l'attivazione del gene avviene già in fase di acclimatamento (fig. 21 D).

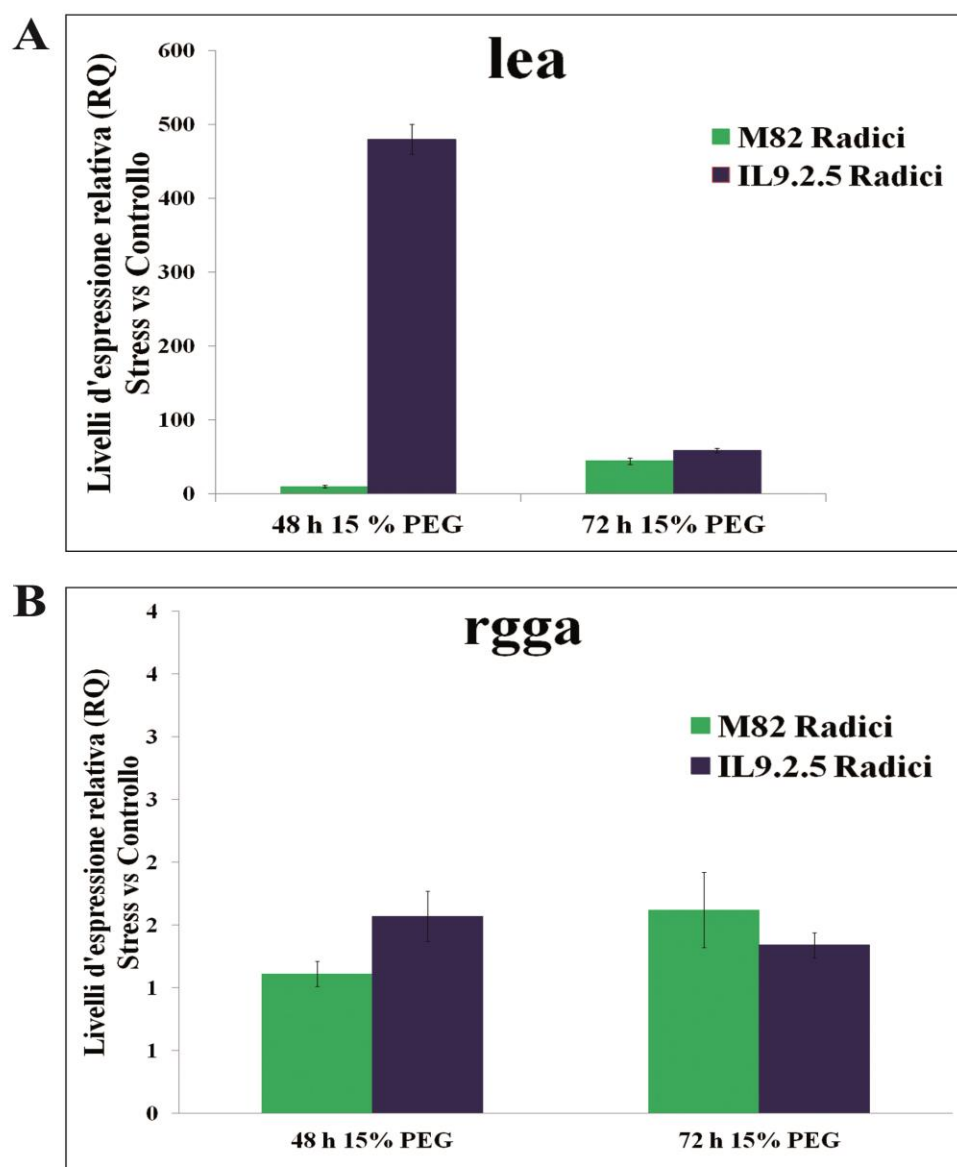


Figura 20. Espressione genica, analizzata mediante qRT-PCR in radici dei genotipi M82 e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.12.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *lea* (A) e *rgga* (B) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ=1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

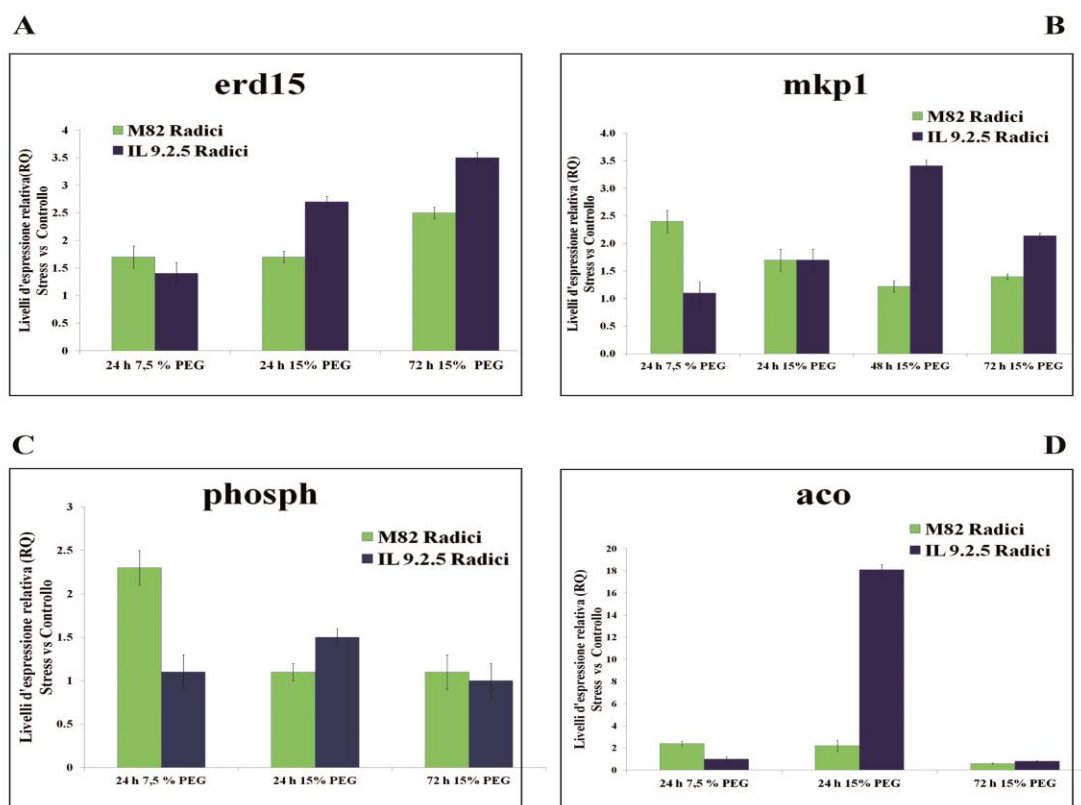


Figura 21. Espressione genica, analizzata mediante qRT-PCR in radici dei genotipi M82 e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.12.

I livelli d'espressione relativa (RQ) dei geni *erd15* (A) e *mkp1* (B) *phosph* (C) ed *aco* (D) sono stati determinati rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Anche nella radice è stata studiata la regolazione della via biosintetica dell'acido abscissico sia a livello molecolare che a livello biochimico. L'analisi dei livelli d'espressione relativa del gene *nced* indica un'immediata regolazione di tale via biosintetica anche in condizioni moderate di stress idrico mediato da PEG al 7,5 % (fig. 22 A). I messaggeri di *nced* incrementano di circa 4 e 2 volte rispettivamente per il genotipo M82 e la linea d'introgressione IL9.2.5. L'analisi qRT-PCR ha rilevato un forte picco dei livelli d'espressione relativa all'intensificarsi dello stress idrico (24 h 15% PEG) con valori di RQ incrementati di circa 16 per le radici di M82 e di 50 volte per la linea IL9.2.5. Nelle successive 72 h di intenso deficit idrico, i dati d'espressione suggeriscono un meccanismo di feedback negativo a livello trascrizionale per il gene *nced* con livelli inferiori rispetto alle prime 24 h di stress idrico (fig. 22 A). Tali risultati sono in accordo con le misurazioni del contenuto in ABA effettuato con metodo ELISA. (fig. 22 B). Il contenuto di ABA nel tessuto radice è pari a circa 50 pmoli g⁻¹ ed è inferiore a quello del tessuto foglia di circa 15 volte. Contrariamente a quanto osservato in foglia, nelle radici l'ABA si accumula in modo rapido e già nella fase di acclimatamento allo stress,. All'intensificarsi del deficit idrico si evidenzia un forte incremento della concentrazione di ABA che raggiunge valori pari a 523,0 pmoli g⁻¹ e 339,4 pmoli g⁻¹ per M82 e IL9.2.5, rispettivamente con un incremento medio di circa di circa 10 volte in entrambi i genotipi analizzati (fig. 22 B).

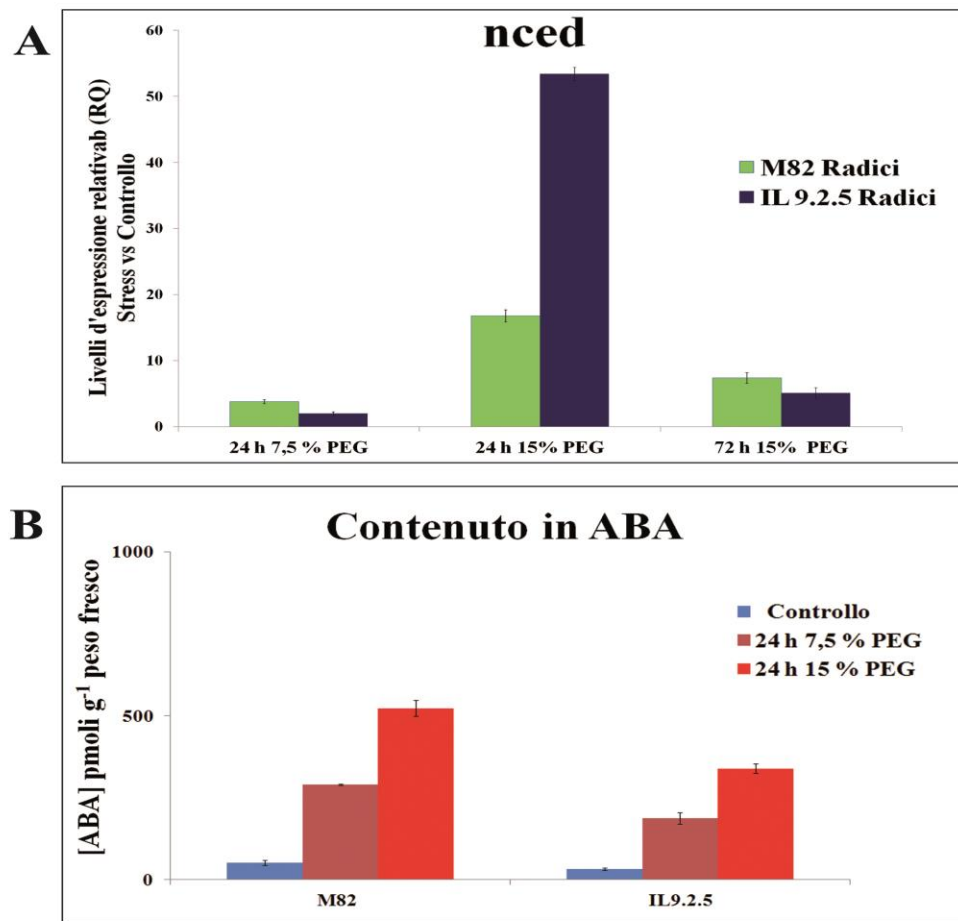


Figura 22. Espressione del gene *nced* (A) e contenuto in ABA (B) in radici dei genotipi M82 e IL9.2.5 allevati in condizioni di controllo e di stress idrico imposto da PEG secondo lo schema riportato in fig.12.

(A) In seguito a qRT-PCR i livelli d'espressione relativa (RQ) sono stati determinati, rispetto a quello di campioni di piante allevate in condizioni controllo (RQ=1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

(B) Contenuto di ABA in radici di pomodoro determinato mediante test ELISA. In blu sono indicate le piante irrigate (Controllo) in rosso quelle sottoposte a stress idrico (PEG).

3.3 Ottenimento di piante transgeniche di pomodoro per la sovra espressione costitutiva e inducibile di geni coinvolti nella risposta a stress termici

Presso il CNR-IGV di Portici studi preliminari hanno permesso di identificare alcuni geni come differenzialmente espressi in bocci fiorali di pomodoro sottoposti a stress termico (Massarelli *et al.* 2004, Giorno *et al.* 2006), alcuni di questi, riportati in tabella 10, sono stati utilizzati nel presente lavoro per uno studio funzionale in pomodoro che ha previsto la costruzione di vettori per la sovraespressione in pianta e la trasformazione di pomodoro con i vettori ottenuti.

3.3 Sviluppo di vettori binari e ottenimento di piante transgeniche.

Le diverse sequenze geniche da clonare sono state ottenute a partire da cDNA proveniente da RNA estratto da bocci fiorali di pomodoro allevati in condizioni di stress termico. La strategia di clonaggio si è basata sul sistema Gateway utilizzando il vettore d'ingresso pDONR207; il vettore ricombinante ottenuto è stato utilizzato in seguito per reazioni di ricombinazione con il vettore binario di destinazione. Sono stati utilizzati a tal scopo due vettori Gateway della serie pGWB (Nakagawa *et al.*, 2007), contenenti la Tag FLAG all'N-terminale del sito di ricombinazione e il marcatore selezionabile NPTII (fig. 23). Un primo vettore utilizzato, pGWB412, presenta il promotore costitutivo 35SCaMV che consente la sovraespressione costitutiva del gene d'interesse in esso clonato (fig. 23 A).Dopo clonaggio dei geni di interesse in tale vettore i plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati indicati come pOx.

Al fine di sviluppare un vettore con promotore inducibile da HS in grado di attivare la trascrizione del gene inserito solo in seguito a stimolo HS, mediante ricerca bibliografica, è stato selezionato il promotore di un gene di pomodoro, che controlla l'espressione di LeHSP23.8, codificante per una sHSP localizzata nei mitocondri (No. AB239774, Yi *et al.*, 2006). Tale promotore una volta isolato è stato inserito al posto del 35S CaMV nel vettore pGWB412 e questo indicato come pIND (fig. 23 B).

Sono stati così sviluppati due costrutti per ciascun gene selezionato per un totale di 13 costrutti.

Al fine di ottenere piante di pomodoro cv. M82 stabilmente trasformate mediante *Agrobacterium tumefaciens* con i costrutti contenenti i geni selezionati (tab. 10) è stato utilizzato il protocollo di Van Roekel (Van Roekel *et al.*, 1993) opportunamente modificato.

Per le trasformazioni sono stati utilizzati 150-300 espianti cotiledonari per ciascun costrutto, da cui sono stati ottenuti *in vitro*, in circa 4-7 settimane, diversi calli da singolo espianto e germogli con un buon apparato radicale che non hanno mostrato differenze fenotipiche rispetto ai relativi controlli (fig. 24 A). Sono state, in questo modo, selezionate piante putativamente transgeniche derivanti da eventi indipendenti di rigenerazione, le quali sono state

allevate *in vivo* per caratterizzarne la risposta molecolare e fisiologica (fig. 24 D).

Tabella 10: Catalogo di geni espressi nel fiore di pomodoro coinvolti nella risposta/tolleranza allo stress da alte temperature ed utilizzati per la trasformazione di *Lycopersicon esculentum* cv M82.

Categoria funzionale	Nome	Descrizione	GeneBank ID
Fattori "Heat shock"	<i>hsf</i>	<i>heat stress transcription factor HsfA.2</i>	X67601
Proteine "Heat shock"	<i>hsp17.6-CII</i>	<i>class II small heat shock protein Le-Hsp17.6</i>	U72396
Proteine di difesa	<i>oec</i>	<i>Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3</i>	EST472372/ AY5687191
Trasduzione del segnale	<i>tgf</i>	<i>TGF-beta receptor, type I, II</i>	C05HBA0042B19.1 CDS 10
Trasduzione del segnale	<i>mpk16</i>	<i>ATMPK16 MAP kinase Arabidopsis thaliana</i>	EST553251
Trasduzione del segnale	<i>ndpk</i>	<i>Nucleoside-diphosphate kinase</i>	SGN-U312978
Proteine di difesa	<i>hsp17.4-CII</i>	<i>cytosolic class II small heat shock protein Hct2</i>	SGN-U216468

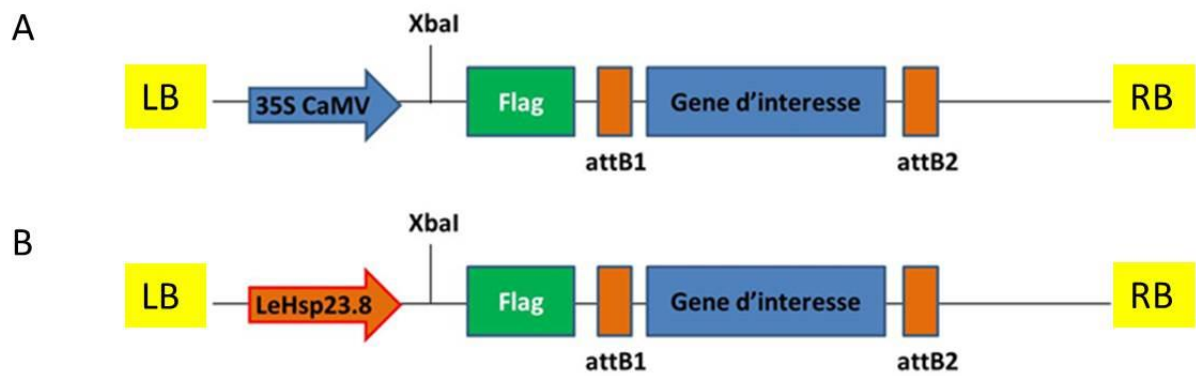


Figura 23. Rappresentazione schematica dei vettori binari utilizzati per il clonaggio dei geni di pomodoro di interesse
 (A) Vettore binario pOx:: plasmide (pGWB412), contenente il promotore costitutivo 35S CaMV per la sovraespressione dei geni di interesse, il marcatore selezionabile NPTII, la Tag FLAG all’N-terminale del sito di ricombinazione.

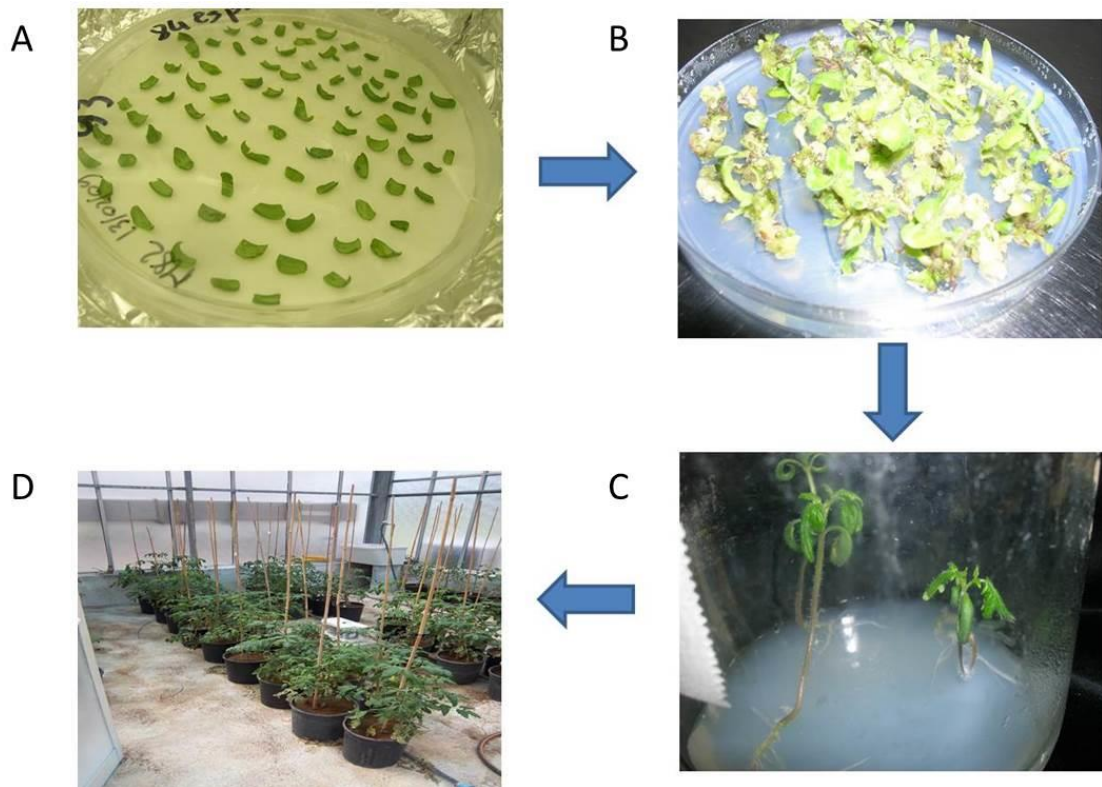


Figura 24. Fasi del protocollo sperimentale per l'ottenimento di piante di pomodoro trasformate. (A) Espianti dopo la co-coltura con *Agrobacterium tumefaciens*. (B). Espianti e calli *in vitro* dopo la trasformazione; (C) piantine *in vitro* in propagazione; (D) piante allevate dopo trapianto in vivo.

Sono state ottenute piante di pomodoro sovraesprimenti i geni di pomodoro *hsfA.2* (*Heat stress transcription factor*), *hsp17.6* (*Cytosolic class II small heat shock protein*), *oec* (*Photosystem II oxygen-evolving complex protein*), *ndpk* (*nucleoside diphosphate kinase*), *tgf* (*TGF-beta receptor*) e *hsp17.4* (*Cytosolic class II small heat shock protein*) sia sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV (indicate come Ox) che di quello del promotore inducibile LeHsp23.8 (indicate come IND). Inoltre, sono state ottenute piante transgeniche sovraesprimenti il gene *mkp16* (*Mitogen-activated protein kinase 16*) sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV.

3.3.2 Screening molecolare delle piante transgeniche

Le piante di pomodoro (cv. M82) trasformate con i 13 costrutti sviluppati, sono state sottoposte a screening molecolare via PCR per controllare la presenza del Ti DNA e delle sequenze esogene utilizzando coppie di primer che amplificano i sette geni d'interesse.

In fig. 25 sono mostrati i risultati dello screening molecolare per le piante trasformate con i costrutti pOx::17.6 e pIND::17.6 utilizzando la coppia di primer Prom35SCaMV for/Hsp17.6 rev e PromLeHsp23.8 for /Hsp17.6 rev, rispettivamente. I risultati dell'analisi molecolare mediata da PCR indicano che la maggior parte dei trasformanti mostrano i frammenti di DNA delle dimensioni attese, di circa 650 bp e di 1000 bp per la piante trasformate con i vettori pOx::17.6 (fig. 25 A) e pIND::17.6 (fig. 25 B), rispettivamente.

Similmente, è stato condotto lo screening molecolare per controllare la presenza del transgene *hsfA.2* per le piante di pomodoro trasformate con i costrutti pOx::HSF e pIND::HSF, utilizzando le coppie di primer Prom35SCaMV for/HSFA.2 rev e PromLeHsp23.8 for/HSFA.2 rev, rispettivamente (fig. 26 A e 26 B). La prima coppia di primer amplifica una regione di 1000 bp, mentre la seconda una di 1650 bp.

In tabella 11, è riportata l'efficienza di trasformazione per ogni costrutto utilizzato, calcolata come la percentuale degli espianti co-coltivati che hanno rigenerato piante transgeniche da eventi indipendenti di trasformazione. In particolare sono state ottenute 21 piante transgeniche Ox17.6, 19 IND17.6, 22 OxHSF e 19 INDHSF con un'efficienza di trasformazione del 6-13%.

Nel presente lavoro di tesi sulle piante transgeniche sovraesprimenti i geni *hsp17.6* e geni *hsfA.2* di pomodoro è stata effettuata una caratterizzazione molecolare e funzionale per definire il ruolo dei geni selezionati nei meccanismi di termotolleranza.

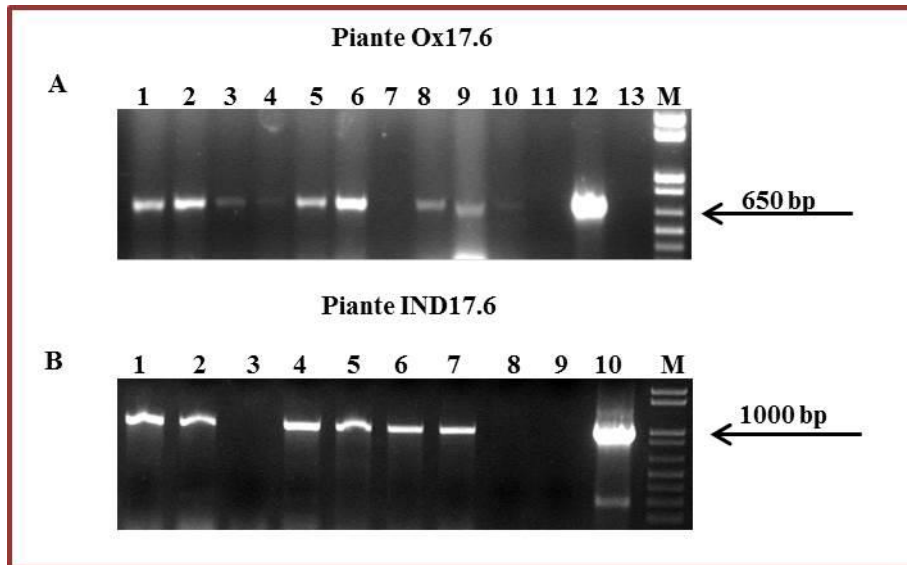


Figura 25. Screening molecolare delle piante trasformate con i costrutti pOx::17.6 (A, piante Ox17.6) e pIND::17.6 (B, piante IND17.6). Elettroforesi dei prodotti di amplificazione del gene hsp17.6. (A) 1-10: putative piante transgeniche; 11 DNA pomodoro non trasformato; 12: plasmide pOx::17.6; 13: no DNA; M: 1 k+ marker. (B) 1-7: putative piante transgeniche; 8:DNA pomodoro non trasformato; 9: no DNA; 10: plasmide pIND::17.6; M: 1 Kb+ marker

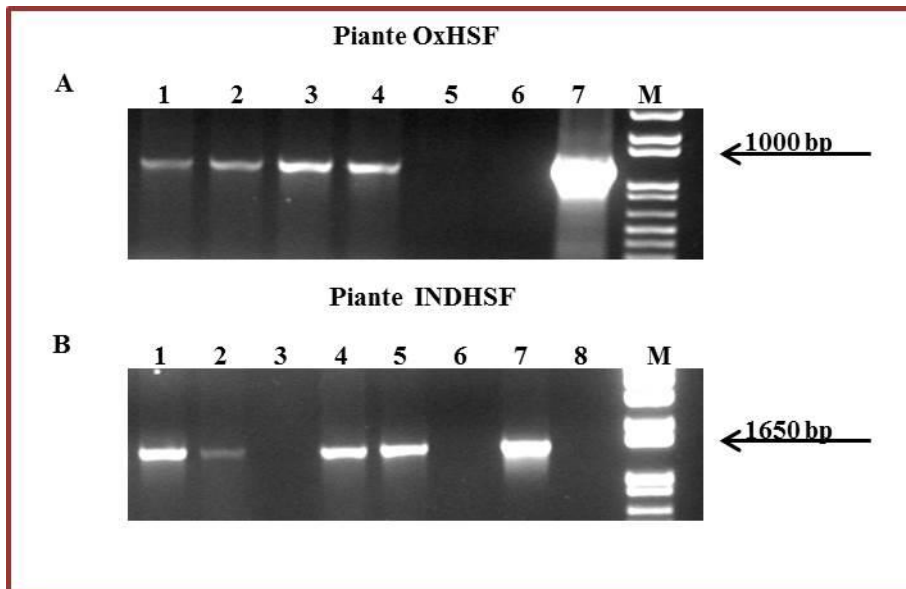


Figura 26. Screening molecolare delle piante trasformate con i vettori binari pOx::HSF (A, piante OxHSF) e pIND::HSF (B, piante IndHSF). Elettroforesi dei prodotti di amplificazione del gene *hsfA2*.
 (A) 1-4: putative piante transgeniche; 5: DNA pomodoro non trasformato; 6: no DNA; 7: plasmide pOx::HSF; M: 1 kb⁺ marker.
 (B) 1-5: putative piante transgeniche; 6: DNA pomodoro non trasformato; 7: plasmide pIND::HSF; 8: mix reazione; M: 1 Kb⁺ marker.

Tabella 11. Risultati degli esperimenti di trasformazione genetica di pomodoro mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

Costrutti	N° di espianti co-coltivati	N° di piante transgeniche.	% Efficienza di trasformazione
Ox::HSF	170	22	12,9 %
IND::HSF	150	19	12,7 %
Ox::Hsp17.6	196	21	10,7 %
IND::Hsp17.6	300	19	6,3 %
Ox::Oec	150	8	5,3 %
IND::Oec	150	10	6,7 %
Ox::Hsp17.4	150	10	6,7 %
IND::Hsp17.4	150	8	5,3 %
Ox::Mpk16	150	6	4,0 %
Ox::Ndpk	150	9	6,0 %
IND::Ndpk	150	14	9,3 %
Ox::Tgf	150	7	4,7 %
IND::Tgf	150	13	8,7 %

3.4 Caratterizzazione ed analisi funzionale di piante sovraesprimenti i geni *hsp17.6* e *hsfA.2*

3.4.1 Selezione delle linee transgeniche

Sulle piante T₀ allevate in vivo è stata poi valutata, mediante RT-PCR semiquantitativa, l'effettiva espressione dei transgeni e *hsp17.6* e *hsfA.2* mediata sia dal promotore costitutivo (35S CaMV) che da quello inducibile (LeHsp23.8) utilizzando le seguenti coppie di primer Flag for/*Hsp17.6* rev e Flag for/*HSFA.2* rev che permettono di amplificare esclusivamente frammenti della cassetta di espressione del T-DNA e non sequenze dei geni endogeni di pomodoro. La coppia di primer Flag for/*Hsp17.6* rev amplifica per una banda di 400 bp mentre la coppia (fig. 27 A) di primer Flag for/*HSFA.2* rev amplifica una regione di 100 bp (fig. 28 A).

I risultati delle analisi RT-PCR indicano che diverse piante esprimono costitutivamente i geni *hsfA.2* e *hsp17.6* sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV (fig. 27 A e fig. 28 A). Come atteso, per la maggior parte delle piante trasformate IND17.6 e INDHSF la sovraespressione dei geni *hsfA.2* e *hsp17.6* è quasi del tutto assente quando è mediata dal promotore inducibile LeHsp23.8 in condizioni controllo (fig. 27 B e 28 B).

Per la successiva caratterizzazione della sovraespressione di *hsp17.6* mediata dal promotore costitutivo 35S CaMV, sono state selezionate le linee transgeniche Ox17.6/2 e Ox17.6/8, la prima sovra-esprime costitutivamente il transgene *hsp17.6* contrariamente alla seconda linea. Per lo studio di *hsp17.6* mediato dal promotore inducibile sono state selezionate le linee: IND17.6/4 e IND17.6/5 che non sovraesprimono in condizioni controllo.

Per la successiva analisi funzionale del gene *hsfA.2* sono state selezionate le linee transgeniche, entrambe sovraesprimenti sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV in condizioni controllo: OxHSF/1 e OxHSF/2. Per le piante transgeniche INDHSF, in cui il gene *hsfA.2* era stato introgresso sotto il controllo del promotore inducibile LeHsp23.8, sono state selezionate le piante INDHSF/7 ed INDHSF/8.

3.4.2 Analisi funzionale dei geni *hsp17.6* e *hsfA.2* in piante transgeniche di pomodoro.

Al fine di studiare il ruolo dei geni selezionati nei meccanismi di risposta a elevate temperature, le piante transgeniche OX e IND ottenute per i geni *hsfA.2* e *hsp17.6* sono state ulteriormente caratterizzate. In particolare, è stato studiato l'effetto della sovraespressione costitutiva o inducibile dei geni sull'espressione di altri geni del network di risposta a condizioni di HS in foglie e antere e sulla vitalità e germinabilità del polline. Per ogni popolazione transgenica sono state analizzate due linee transgeniche della generazione T₁, generate da due eventi indipendenti di trasformazione.

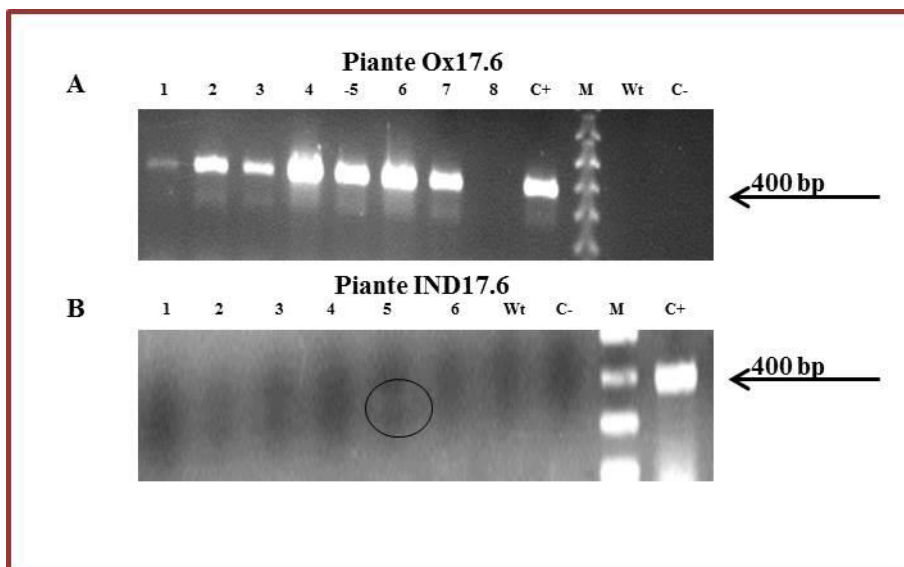


Figura 27. Espressione del gene transgene nelle piante Ox17.6 e IND17.6, utilizzando primer specifici per il gene esogeno *hsp17.6*.

A) Elettroforesi dopo RT-PCR delle piante T₀ Ox17.6. 1-8: cDNA piante transgeniche; C⁺: plasmide pOx::Hsp17.6; M: 1 kb⁺ marker; Wt: cDNA pomodoro non trasformato, C⁻: no cDNA.

B) Elettroforesi dopo RT-PCR delle piante T₀ Ind17.6, 1-6: piante transgeniche; Wt: DNA pomodoro non trasformato; C⁻: no cDNA; M: marker 1 Kb⁺; C⁺: plasmide pIND::Hsp17.6.

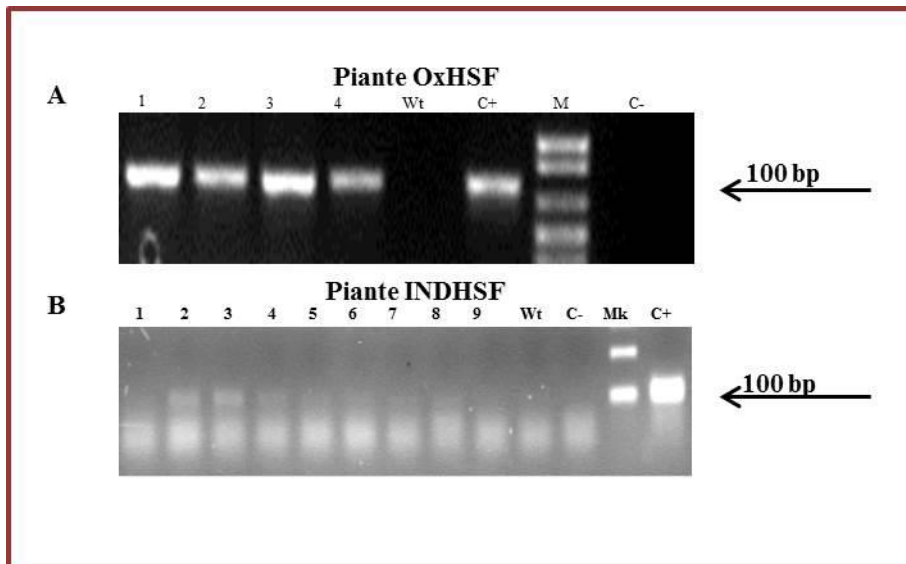


Figura 28. Espressione del transgene nelle piante OxHSF e INDHSF, utilizzando primer specifici per il gene esogeno *hsfA2*.

A) Elettroforesi dopo RT-PCR delle piante T₀ OxHSF. 1 -4: piante transgeniche; Wt: DNA pomodoro non trasformato; C⁺: plasmide pOx::HSF; C⁻: no cDNA; M: 1 kb⁺ marker.

B) Elettroforesi dopo RT-PCR delle piante T₀ INDHSF, 1-9: piante transgeniche; Wt: DNA pomodoro non trasformato; C⁻: no cDNA; Mk: marker 1 Kb⁺; C⁺: plasmide pIND::HSF.

3.4.2 a Analisi dei profili di espressione genica in foglie e antere di e piante OX17.6 ed IND17.6

Piante transgeniche di pomodoro *Lycopersicon esculentum* cv M82 trasformate con i costrutti pOx::17.6 (linee Ox17.6/2 e Ox17.6/8 che in T₀ sovraesprimeva e non il transgene, rispettivamente) e pIND::17.6 (linee IND17.6/4 e IND17.6/5 che non sovraesprimevano i transgeni in condizioni controllo) sono state allevate in condizione di temperature controllo (25°C) e in condizioni di alte temperature (36°C) in serre condizionate.

Piante transgeniche Ox17.6

Allo scopo di analizzare l'effetto della sovraespressione della chaperonina *hsp17.6* è stato analizzato il profilo d'espressione dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e *hsfA.2* in foglia e antere, mediante analisi qRT-PCR in piante controllo e in piante sottoposte a trattamento HS.

Nelle piante della linea Ox17.6/2 in condizioni normali di allevamento (25°C) si evidenzia che la sovraespressione costitutiva del gene *hsp17.6* (fig. 29 A) determina nelle foglie un drastico accumulo di trascritti che codificano per la chaperonina *hsp17.4* (fig. 29 C). In tali condizioni la sovraespressione non ha invece effetto sull'espressione del fattore di trascrizione *hsfA.2* (fig. 29 E). Come atteso nella linea transgenica Ox17.6/8, scelta perché non sovra-esprime il transgene, il profilo d'espressione dei geni analizzati non varia rispetto a quello delle piante del genotipo non trasformato cv M82.

In risposta a condizioni di alte temperature (36°C), che inducono la risposta molecolare HS endogena, sia nelle piante transgeniche Ox17.6 e che nel genotipo non trasformato M82 è stato osservato un notevole incremento relativo dei messaggeri dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e *hsfA.2*.(fig. 29 B, D ed F).

La cv M82 non trasformata mostra per i tre geni in esame un atteso profilo di espressione regolato dalle alte temperature, infatti in condizioni controllo i livelli dei geni endogeni sono molto bassi per poi aumentare in condizioni di HS.

Nelle piante transgeniche invece il profilo di espressione in risposta ad HS risulta peculiare. Rispetto alle piante allevate in condizioni controllo le linee transgeniche in condizioni HS accumulano una minor quantità relativa di trascritti delle due chaperonine, per un probabile meccanismo di feedback negativo della regolazione trascrizionale delle due HSP. Inoltre in condizioni HS sembra esserci un diretto effetto dell'accumulo del transgene nella regolazione dei livelli di trascritti della chaperonina *hsp 17.4*. Infatti nelle piante Ox17.6/2 i livelli di trascritti di *hsp17.4* sono inferiori a quelli della pianta non trasformata cv M82 (fig. 29 D). L'espressione del gene *hsfA2* sembra invece regolata diversamente, infatti come atteso il gene è inducibile da condizioni di HS sia in M82 che nelle linee transgeniche ma è interessante evidenziare un

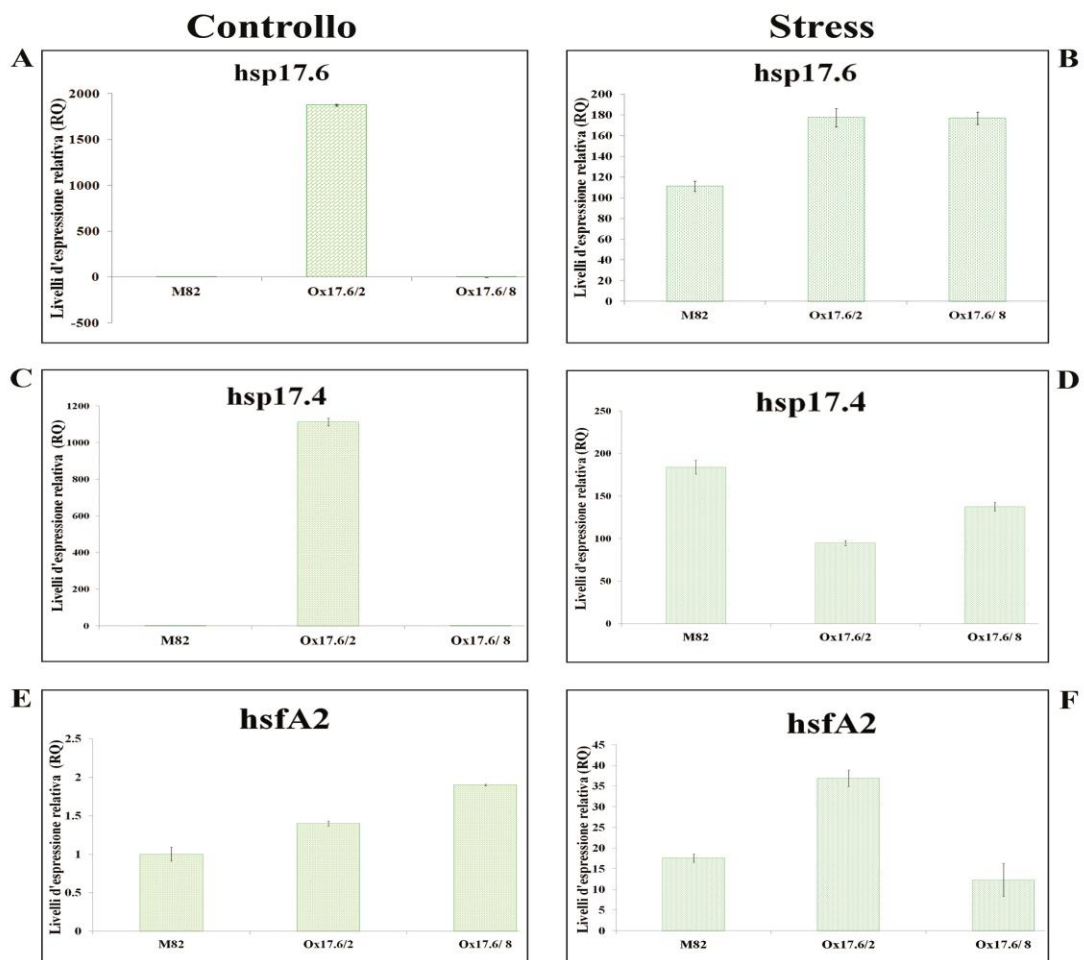


Figura 29. Espressione genica in foglie di piante trasformate Ox17.6 (linee OX17.6/2, OX17.6/8) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ=1). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

maggiore accumulo di trascritti *hsfA2* nelle foglie della linea OX17.6/2 che maggiormente accumula *hsp17.6* (fig. 29 F).

Parallelamente allo studio di espressione genica mediante qRT-PCR in foglie, è stata analizzata l'espressione dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e di *hsfA.2* in antere di 10 mm al primo giorno di antesi in piante di pomodoro sovraesprimenti *hsp17.6* (fig. 30).

In condizioni di temperature controllo, nella linea transgenica Ox17.6/2 è confermata la sovraespressione costitutiva della *heat shock protein* di classe II *hsp17.6* (livelli d'espressione relativa di 250 volte maggiori rispetto ai valori della cv M82) (fig. 30). La sovra espressione del transgene (linea Ox17.6/2) induce accumulo di trascritti relativi al gene *hsp17.4* ma non ha effetto sull'espressione del fattore di trascrizione *hsfA2*, similmente a quanto osservato nelle foglie (fig. 30 C-E). Inoltre, si conferma che nella linea Ox17.6/8, che non esprime il transgene, i livelli di espressione genica dei tre geni in esame sono molto ridotti, suggerendo nella antera un effetto di silenziamento del transgene anche sull'espressione del gene endogeno.

In risposta a condizioni di HS, similmente a quanto osservato nelle foglie, nella linea OX17.6/2 si osserva un significativo aumento dei valori di espressione relativa per entrambe le chaperonine in esame. Le due chaperonine sono inducibile nelle antere della cv M82, ma i livelli di espressione relativa in tale tessuto sono molto inferiori a quelli evidenziati nelle foglie (fig. 30 B, D e F).

Nelle antere delle linee transgeniche analizzate e della cultivar M82, non è stata invece evidenziata alcuna variazione dei livelli d'espressione del fattore trascrizione *hsfA2*, la cui espressione non risulta quindi non inducibile da condizioni di HS in questo tessuto (fig. 30 F).

Piante transgeniche IND17.6

Quando la sovraespressione del gene *hsp17.6* è sotto il controllo del promotore inducibile LeHsp23.8 (linee IND17.6/4 e IND17.6/5), come atteso, in condizioni di temperature controllo (25°C) non si rileva un elevato accumulo di trascritti relativi al gene *hsp17.6* in (fig. 31 A, C ed E). In una delle due linee transgeniche (IND17.6/5), a causa probabilmente di un livello minimo di espressione basale del promotore inserito, è possibile evidenziare un aumento dei livelli dei trascritti dei geni *hsp17.4* e *hsfA2* anche a temperature normali di allevamento.

Condizioni di HS alte temperature inducono l'accumulo di trascritti dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e *hsfA.2* sia nelle delle piante trasformate che nella cv M82 in modo differente. Nella linea IND17.6/4 i livelli di induzione dei gene in esame sono più bassi rispetto a M82 e alla linea IND17.6/5 (fig. 31 B) ciò suggerisce che in tale linea il transgene non si esprima e che sia indotto esclusivamente

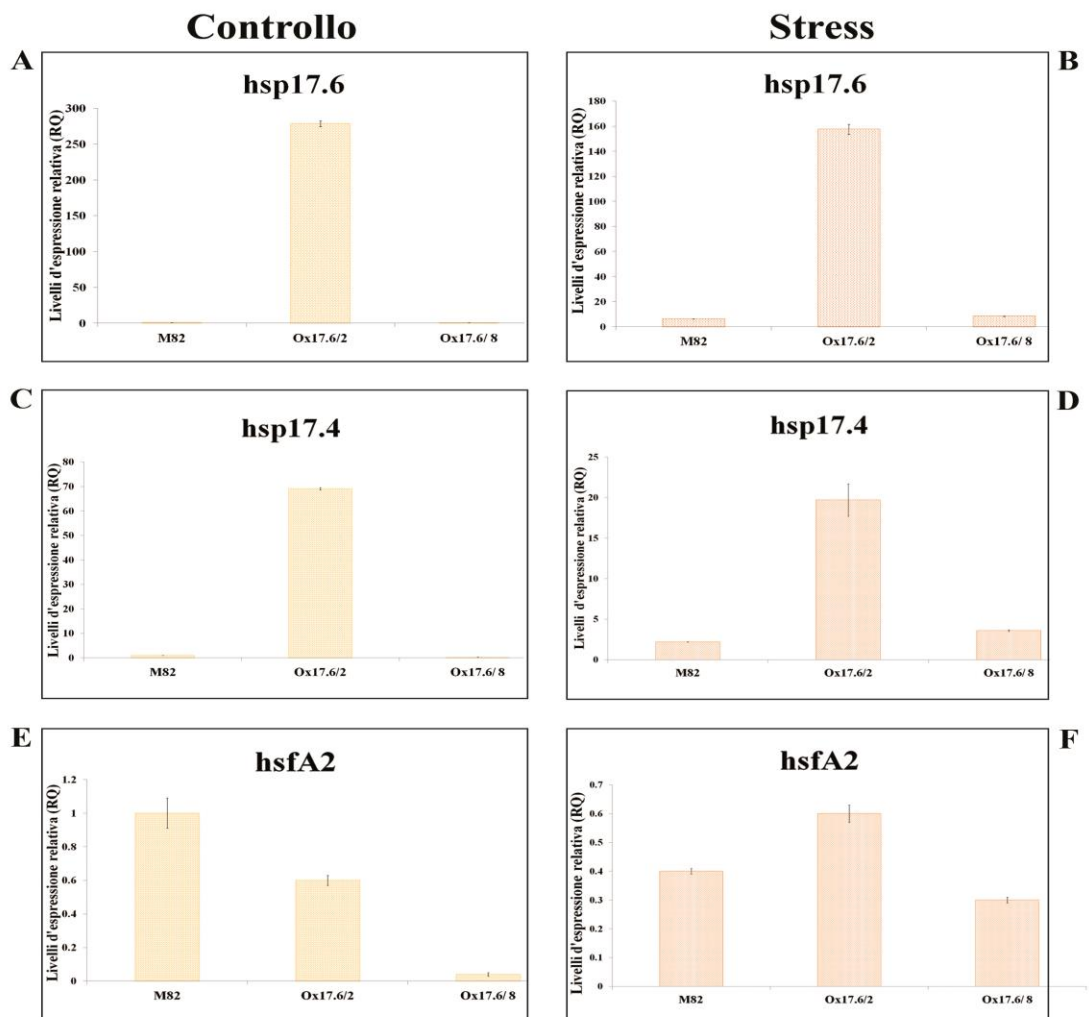


Figura 30. Espressione genica in antere di piante trasformate Ox17.6 (linee Ox17.6/2 e Ox17.6/8) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene LeEF 1 α è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

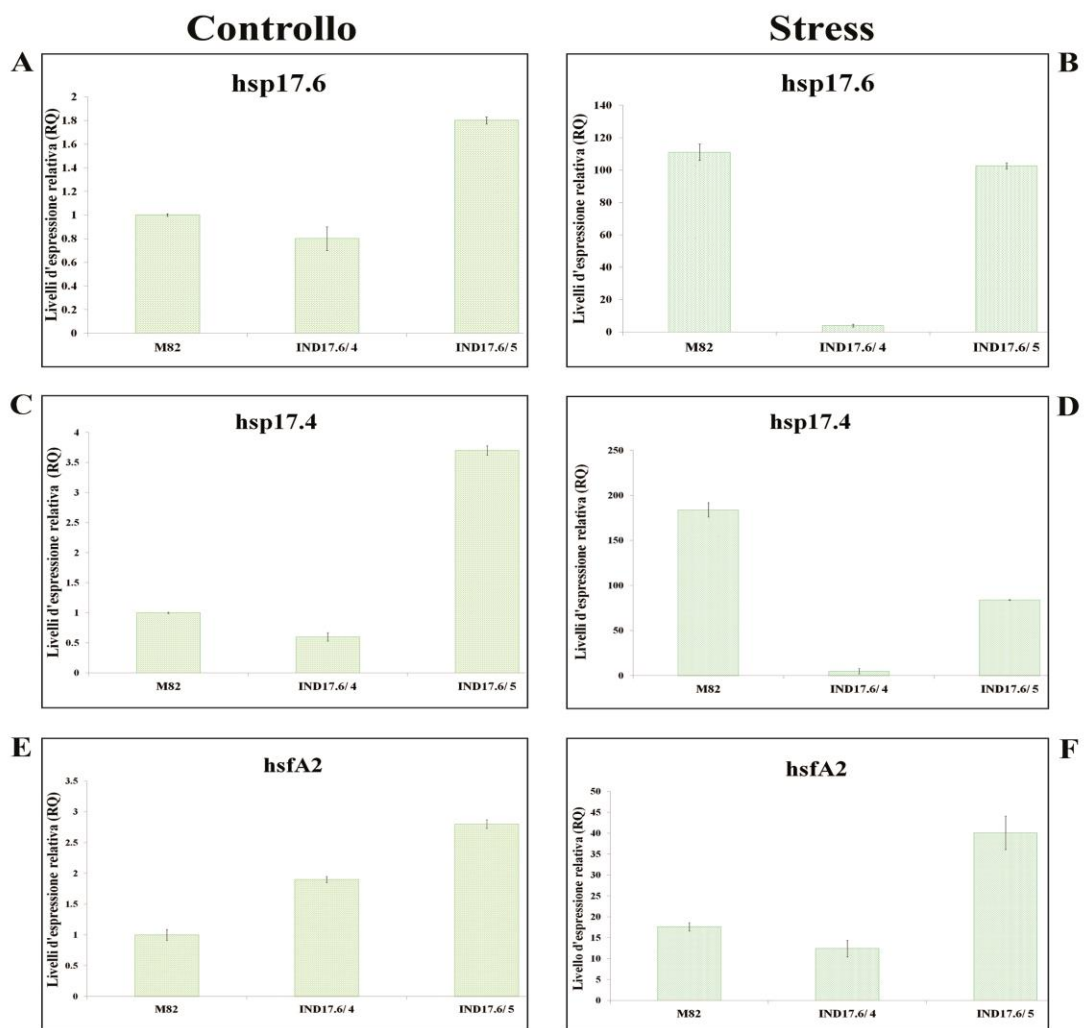


Figura 31. Espressione genica in foglie di piante trasformate IND17.6 (linee IND17.6/4 e IND 17.6/5) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

l'espressione del gene endogeno; mentre nelle piante IND17.6/5, che l'espressione dei 3 geni è fortemente indotta. In particolare il gene *hsfA2* ed i livelli di ei suoi trascritti risultano regolati dalla sovraespressione del transgene così come già evidenziato nelle piante Ox17.6.

In figura 32 sono mostrati i risultati dell'analisi d'espressione relativa delle antere di 10 mm prelevate da piante transgeniche IND17.6 sia in condizioni di temperature controllo (fig. 32 A, C ed E.) e di alte temperature (fig. 32 B, D e F). Nelle condizioni di temperature controllo di allevamento l'analisi qRT-PCR ha evidenziato che le linee IND17.6/4 IND17.6/5 non esprimono il transgene e che nella linea IND17.6/5 c'è un probabile silenziamento del gene endogeno. La chaperonina *hsp17.4* e il fattore di trascrizione *hsfA2* come atteso non sono indotte in condizioni di controllo. Condizioni di stress da alte temperature (fig. 32 B, D e F) inducono l'induzione del gene *hsp17.6* e della chaperonina *hsp17.4* solo nel genotipo M82. I dati indicano un probabile silenziamento del gene endogeno e un funzionamento ridotto del promotore LeHsp 23.8.

3.4.2.b Effetto della sovraespressione del gene codificante di *hsp17.6* sulla vitalità e la germinabilità del polline

Granuli pollinici, prelevati da antere al primo giorno di antesi da piante allevate in condizioni controllo (25°C) e in condizioni di heat stress (36°C) in serre condizionate, sono stati processati così come descritto nel capitolo Materiali e Metodi. I granuli pollinici sono stati classificati come germinati quando il tubetto pollinico è risultato uguale o maggiore al diametro del granulo stesso. Quelli non germinati sono stati classificati come vitali e non-vitali a seconda della colorazione che assumeva il citoplasma in seguito a colorazione con la soluzione di Alexander.

In condizioni di temperature controllo (25°C) non è stata osservata nessuna variazione significativa sia della vitalità dei granuli pollinici (tab. 12) che della germinabilità del polline (fig. 33 A e B) nelle linee transgeniche OX e IND oggetto di studio,

La percentuale di germinazione dei granuli pollinici della cultivar *wildtype* cv M82 è risultata essere pari al 55,1% in condizioni controllo. Tale percentuale diminuisce di circa 2,5 volte in condizioni di stress da alte temperature. Tra i granuli pollinici non germinati sono stati classificati il 33% come vitali per entrambe le condizioni sperimentali. Significativa è risultata la differenza delle percentuali dei granuli non vitali tra i due trattamenti cui sono state sottoposte le piante (fig. 33 A e B). In seguito a trattamento con heat stress (36°C), la percentuale di germinazione dei granuli pollinici della linee transgeniche Ox17.6/2 si riduce dal 55,1% al 22,6%; per la linea Ox17.6/8 dal 58,5% al 17,3%.

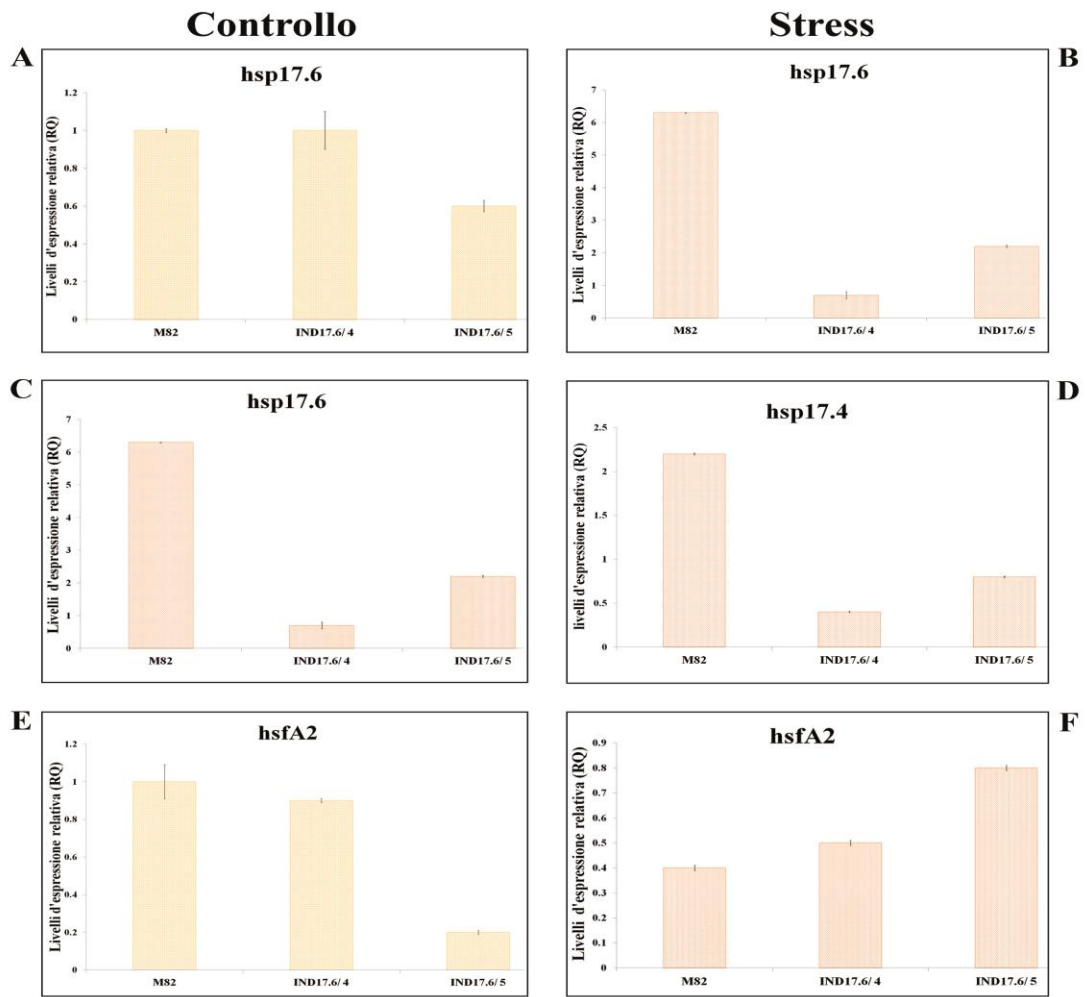


Figura 32. Espressione genica in antere di piante trasformate IND17.6 (linee IND17.6/4 e IND17.6/5) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 12: Analisi della vitalità dei granuli pollinici delle piante transgeniche **Ox17.6** e **IND17.6**

Condizioni Controllo (25°C)		
Genotipi	Granuli pollinici	
	%Non Vitali	%Vitali
M82	11,3 ± 1,4	88,7 ± 1,4
Ox17.6/2	10,8 ± 1,2	89,2 ± 1,2
Ox17.6/8	11,9 ± 1,8	88,1 ± 1,8
IND17.6/4	15,5 ± 3,0	84,5 ± 3,0
IND17.6/5	13,8 ± 1,2	86,2 ± 1
Heat Stress (36°C)		
	%Non vitali	%Vitali
M82	43,9 ± 5,4	56,1 ± 5,4
Ox17.6/2	43,7 ± 3,1	56,3 ± 3,1
Ox17.6/8	61,2 ± 6,9	38,8 ± 6,9
IND17.6/4	43,9 ± 4,4	56,1 ± 4,4
IND17.6/5	54,9 ± 1,6	45,1 ± 4,4

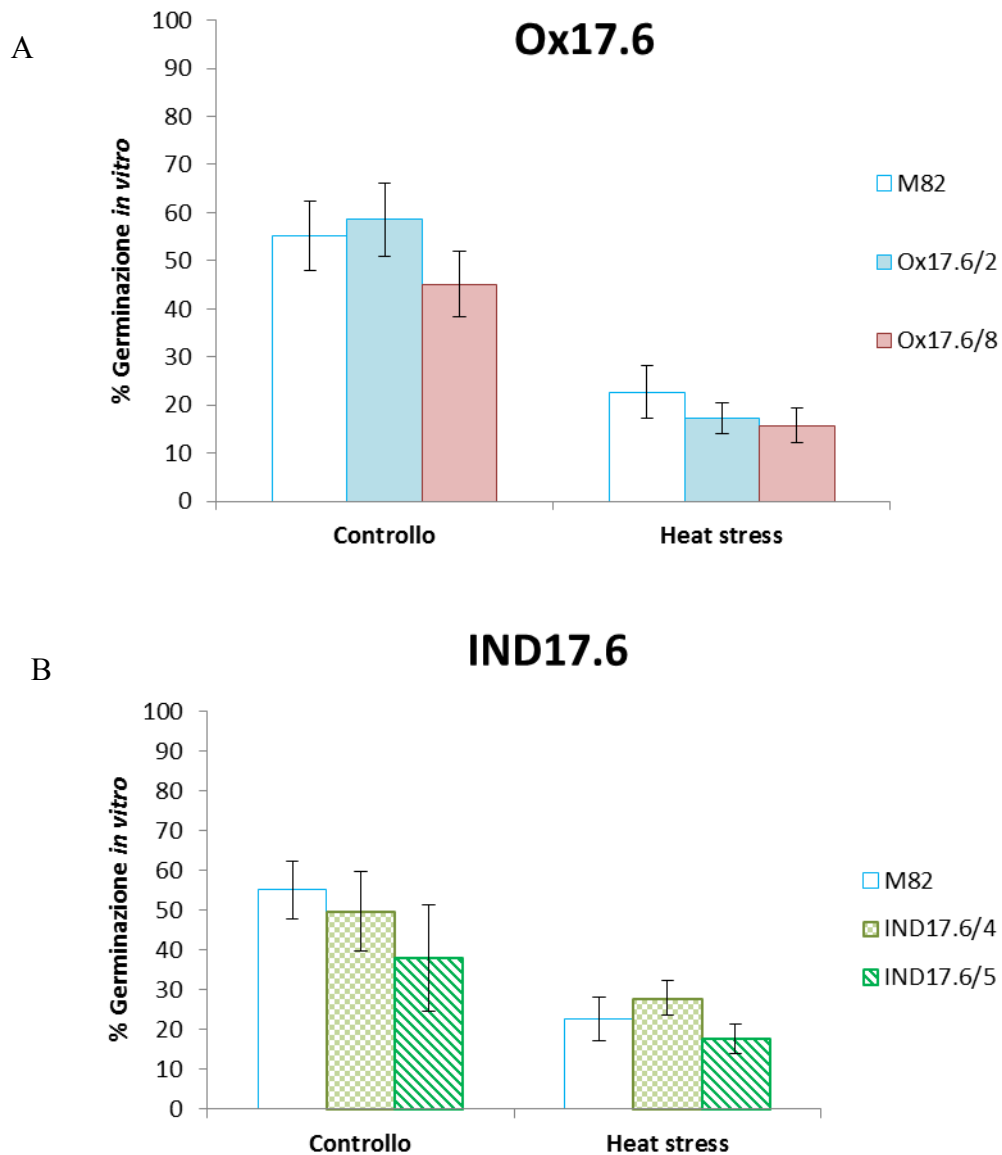


Figura 33. Analisi della germinazione *in vitro* dei granuli pollinici di pomodoro. Sono stati analizzati i granuli pollinici prelevati da antere di 10 mm di piante allevate in condizioni di temperature controllo (25°C) e di alte temperature (heat stress, 36°C) del genotipo cv M82 e delle piante trasformate Ox17.6 (linee Ox17.6/2 e Ox17.6/8) (A) e IND17.6 (linee IND17.6/4 e IND17.6/5) (B).

Per entrambe le popolazioni T₁ analizzate, la percentuale dei granuli pollinici non vitali aumenta di circa quattro volte mentre la vitalità del polline non risulta variare. L'analisi della germinazione *in vitro* e della vitalità dei granuli pollinici delle piante delle popolazioni IND17.6/4 e IND17.6/5 non ha evidenziato variazioni significative delle percentuali delle due categorie in cui sono stati classificati i granuli pollinici rispetto alle piante del genotipo *wild type* (fig. 33 A e B).

3.4.2. c Analisi dei profili di espressione genica in foglie e antere di piante OxHSF e INDHSF.

Piante transgeniche di pomodoro *Lycopersicon esculentum* cv M82 trasformate con i costrutti pOx::HSF (linee OxHSF/1 e OxHSF/2) e pIND::HSF (linee INDHSF/7 e INDHSF/8.) sono state allevate in condizione di temperature controllo (25°C) e in condizioni di alte temperature (36°C) in serre condizionate.

Piante transgeniche OxHSF.

Allo scopo di analizzare l'effetto della sovraespressione del fattore di trascrizione *hsfA2* è stato analizzato il profilo d'espressione dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4* e *hsfA.2* in foglia e antere, mediante analisi qRT-PCR in piante controllo e in piante sottoposte a trattamento HS.

Nelle foglie di piante T₁ della linea transgenica OxHSF/1 (fig. 34 A, C ed E), allevate in condizioni controllo, è stata osservata un incremento minimo (RQ= 1,4) del gene *hsfA2* che determina un maggior accumulo dei trascritti dei geni codificanti per le due chaperonine oggetto di studio. Nelle stesse condizioni sperimentali, nelle foglie delle piante nella linea OxHSF/2 non è stata osservata alcuna sovraespressione del fattore trascrizionale in esame e la tecnica qRT-PCR non ha rilevato induzione dell'espressione del gene *hsp17.4* e *hsp17.6* come evidenziato in figura 34 (A, C ed E). In risposta a condizioni di stress termico nella linea transgenica OxHSF/1 si osserva un notevole accumulo dei trascritti del gene *hsfA2* (RQ= 70). Un maggior accumulo dei trascritti di *hsfA2* determina una variazione del profilo dei geni *hsp17.6* e *hsp17.4*, la cui espressione è notevolmente indotta (RQ= 1200 per il gene *hsp17.6*, RQ= 2700 per il gene *hsp17.4*). Nella linea transgenica OxHSF/2, il profilo d'espressione dei tre geni non è inducibile e i livelli dei trascritti sono confrontabili con quelli della cv M82 non trasformata.

L'analisi d'espressione genica delle piante OxHSF e INDHSF è stata condotta anche in antere di 10 mm al primo giorno di antesi. Nelle antere della linea OxHSFA/1, così come osservato per il tessuto foglia, i messaggeri del fattore trascrizionale *hsfA2* e delle due chaperonine (*hsp17.4* e *hsp17.6*) analizzate hanno livelli simile a quelli presenti in M82 controllo (fig. 35 A, C ed E). Nella antere di 10 mm (al primo giorno di antesi) di tutte e tre i genotipi, l'analisi qRT-PCR non

ha evidenziato in risposta alle alte temperature nessuna induzione del gene che codifica il fattore trascrizionale *hsfA2*.

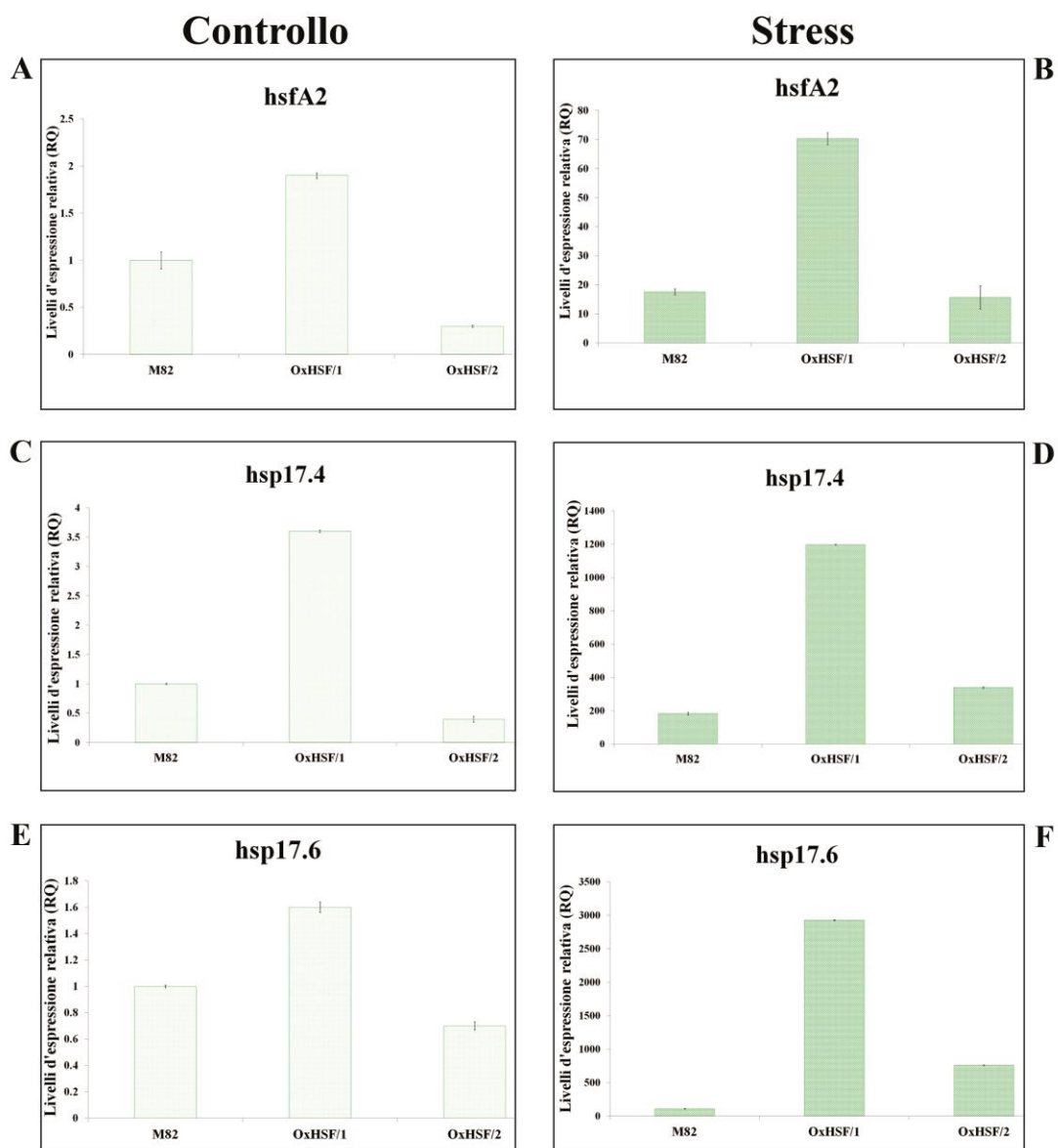


Figura 34. Espressione genica in foglie di piante trasformate OxHSF (linee OxHSF/1, OxHSF/2) in condizioni di temperature controllo (A, C e E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *HSP17.4*, *HSP17.6* e *HSFA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ=1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

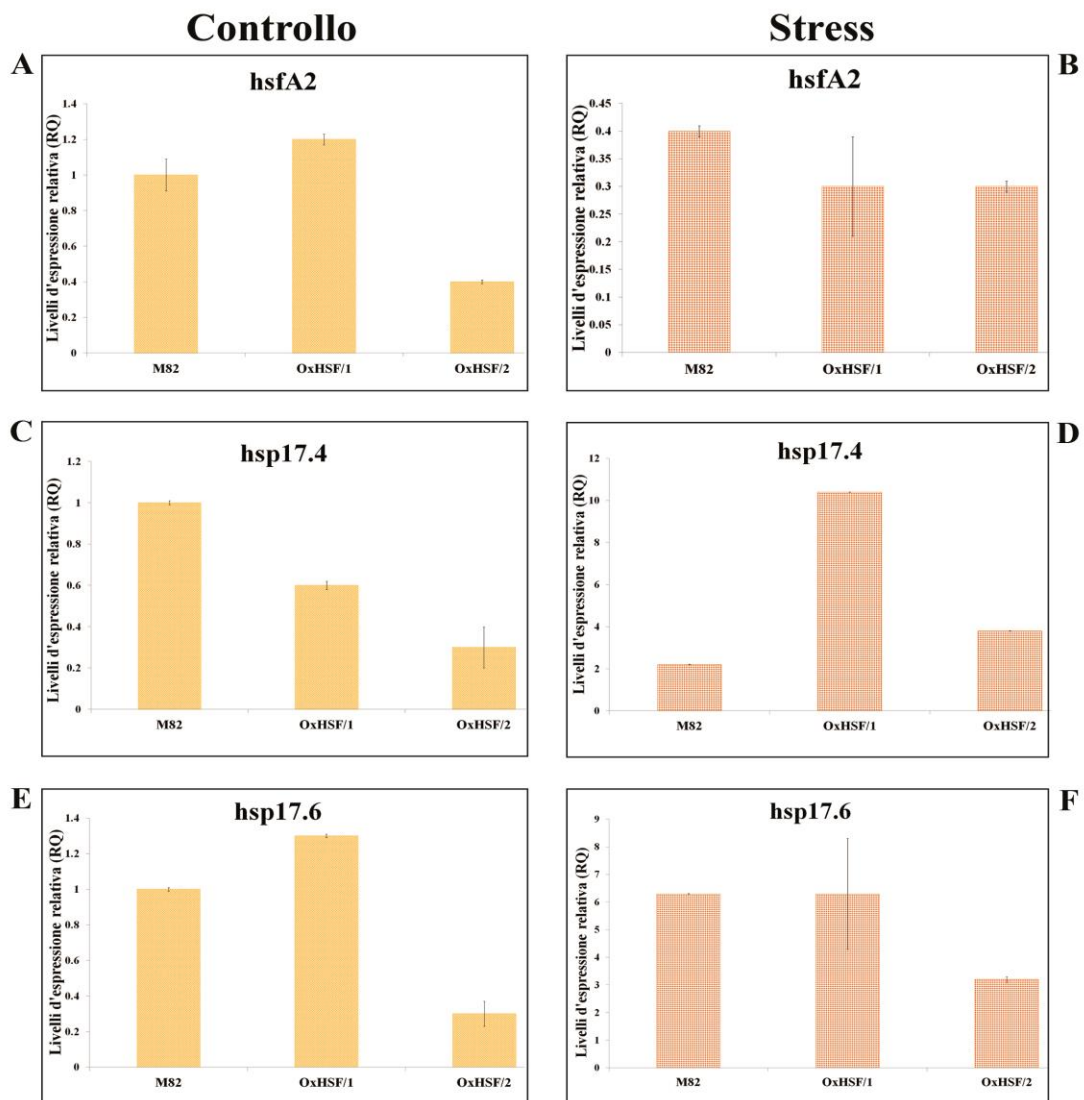


Figura 35. Espressione genica in antere di piante trasformate OXHSF (linee OXHSF/1, OXHSF/2) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Come riportato in figura 34 D-E, nella linea OxHSF/1, confermando quanto riportato nelle foglie, è evidente in risposta ad HS un aumento dell'espressione di *hsp17.4* e *hsp17.6*.

Nella antere di 10 mm (al primo giorno di antesi) di tutte e tre i genotipi, l'analisi qRT-PCR non ha evidenziato in risposta alle alte temperature nessuna induzione del gene che codifica il fattore trascrizionale *hsfA2*. Come riportato in figura 34 D-E, nella linea OxHSF/1, confermando quanto riportato nelle foglie, è evidente in risposta ad HS un aumento dell'espressione di *hsp17.4* e *hsp17.6*. Invece nelle antere della linea OxHSF/2 i geni *hsfA2* sia esogeno che endogeno non sembrano siano trascritti e/o non risultano inducibili da HS (fig. 35 B, D e F).

Piante transgeniche INDHSF

Parallelamente è stato analizzata la risposta molecolare alle alte temperature delle piante trasformate con il costrutto pIND::HSF. Come si può osservare in figura 14, nelle foglie delle linee INDHSF/7 e INDHSF/8 i valori dei livelli d'espressione relativa del gene *hsfA2* sono raddoppiati rispetto a quelli della cultivar M82 in condizioni di temperature controllo (fig. 36 A, C ed E) tale risultato indica che il promotore inducibile è attivo a livelli basali anche in assenza di stress termici.

In condizione di stress da alte temperature, i livelli d'espressione relativa del gene *hsfA2* delle due linee analizzate sono risultati incrementati in modo significativo (RQ= 35 circa) rispetto a quelli di M82 (fig. 36 B, D e F). La sovraespressione del fattore trascrizionale *hsfA2* in entrambe le linee testate ha un effetto diretto sulla variazione della trascrizione di alcuni geni a valle come *hsp17.6* e *hsp17.4*. Infatti, l'analisi qRT-PCR rivela che i rapporti relativi sono maggiori nelle linee transgeniche rispetto al genotipo WT soprattutto per il gene *hsp17.6* (aumentato nelle transgeniche di circa 8 volte rispetto al livello del controllo).

L'analisi d'espressione genica è stata condotta anche in antere di 10 mm al primo giorno di antesi. Nelle piante INDHSF/8, in condizioni di temperature controllo (25°C), i livelli d'espressione relativa del transgene *hsfA2* risultano debolmente aumentati e così i livelli di trascritti relativi ai geni codificanti le chaperonine *hsp17.6* (RQ= 1,7) e *hsp17.4* (RQ= 2,3) (fig. 37 A, C ed E).

L'analisi qRT-PCR ha evidenziato inoltre che nelle antere in seguito a stress termico i livelli di espressione relativa dei trascritti per il gene *hsfA.2* sono molto ridotti. Inoltre nelle linee INDHSF gli elevati livelli di induzione del gene *hsp17.4* (RQ= 7 nella linea 7, RQ= 3,2 nella linea 8) sembrano essere il risultato della contemporanea espressione del transgene e del gene endogeno di pomodoro.

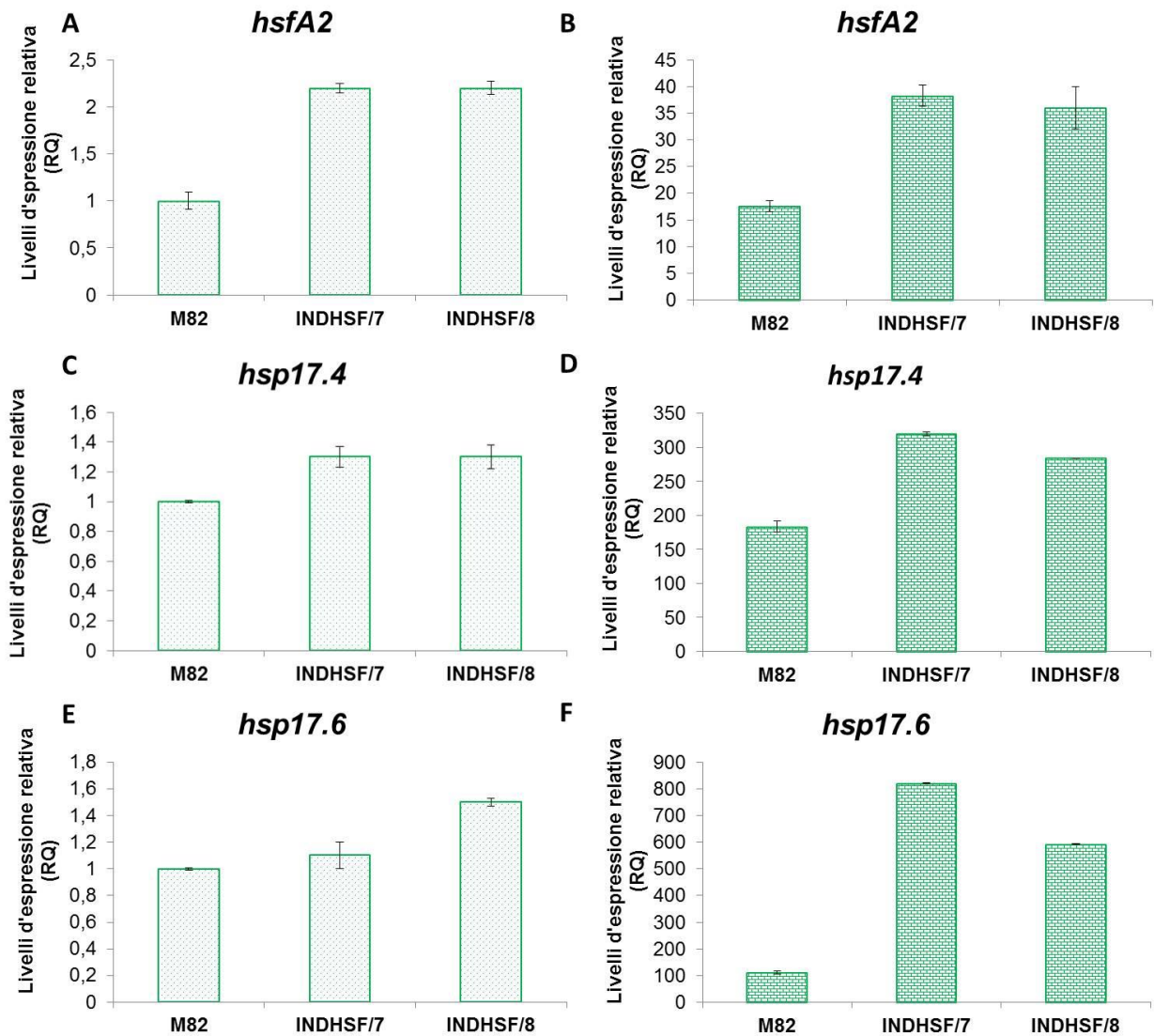


Figura 36. Espressione genica in foglie di piante trasformate INDHSF (linee OXHSF/7 e OXHSF/8) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato.

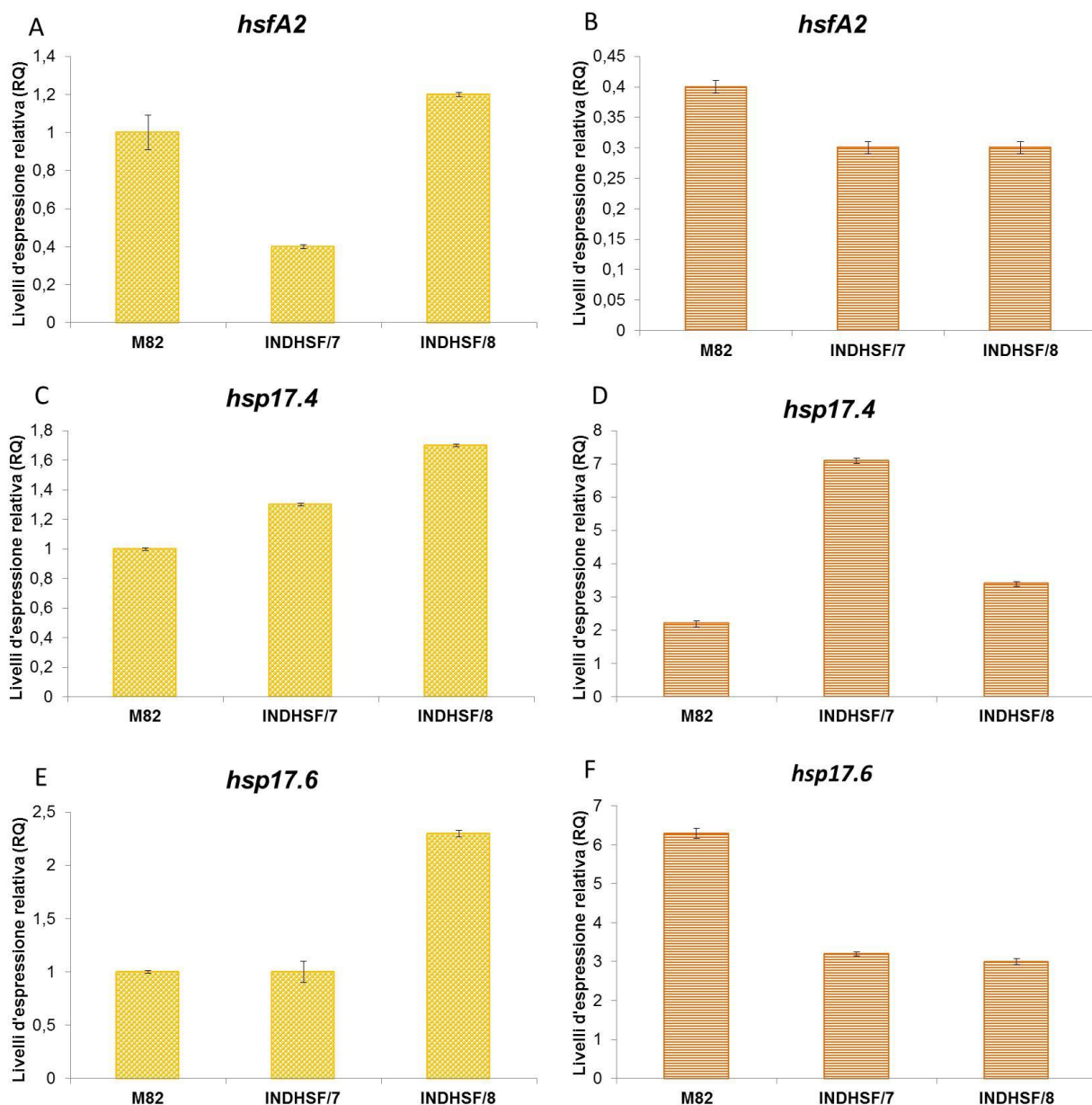


Figura 37. Espressione genica in antere di piante trasformate INDHSF (linee OXHSF/7 e O_xHSF/8) in condizioni di temperature controllo (A, C ed E) e di alte temperature (B, D e F). I livelli di espressione relativa (RQ) dei geni *hsp17.4*, *hsp17.6* e *hsfA2* sono stati determinati, mediante qRT-PCR, rispetto a quello di campioni di piante M82 in condizioni controllo (RQ= 1). Il gene *LeEF 1 α* è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione. I dati rappresentano la media di due esperimenti di qRT-PCR in cui ogni campione è stato analizzato in triplicato

3.4.2d Effetto della sovraespressione del gene *hsfA2* sulla vitalità e germinabilità del polline.

Parallelamente è stato studiato l'effetto della sovraespressione del gene codificante per il fattore trascrizionale *hsfA.2* sulla vitalità e germinabilità del polline di pomodoro in condizioni di temperature controllo e di alte temperature. la vitalità dei granuli pollinici, nelle piante OXHSF tale parametro risulta più alto (di circa il del 3-4%) rispetto a quella della cv M82 (tab. 13); la linea OXHSF/1 sembra risentire meno delle condizioni di HS anche in termini di germinazione *in vitro*. I parametri di germinazione *in vitro* e di vitalità, sono stati studiati anche le piante sovraesprimenti il gene *hsfA.2* sotto il controllo del promotore LeHsp23.8 (fig. 38 B). Per la linea transgenica INDHSF/7, che ha prodotto in totale un numero di granuli molto scarso (dati non mostrati) si è osservato un incremento significativo dei granuli pollinici non vitali così come una diminuzione della germinazione in seguito allo stress termico in accordo con il profilo di espressione del gene *hsfA2* che risulta silenziato (fig. 38 B).

Tabella 13. Analisi della vitalità dei granuli pollinici nelle piante **OxHSF** e **INDHSF**.

Condizioni Controllo (22°C)

Genotipo	Granuli pollinici %	
	% Non Vitali	% Vitali
M82	11,3 ± 1,4	88,7 ± 1,4
OxHSF/1	8,3 ± 1,0	91,7 ± 1,0
OxHSF/2	10,8 ± 1,4	89,2 ± 1,4
INDHSF/7	15,4 ± 3,5	84,6 ± 3,5
INDHSF/8	13,9 ± 2,7	86,1 ± 2,7

Heat Stress (36°C)

Genotipo	Granuli pollinici	
	% Non Vitali %	%Vitali
M82	43,9 ±	56,1 ±
OxHSF/1	38,0 ± 5,4	62,0 ± 5,4
OxHSF/2	36,1 ± 2,5	63,9 ± 2,5
INDHSF/7	82,1 ± 8,2	17,9 ± 8,2
INDHSF/8	49,5 ± 5,6	50,5 ± 5,6

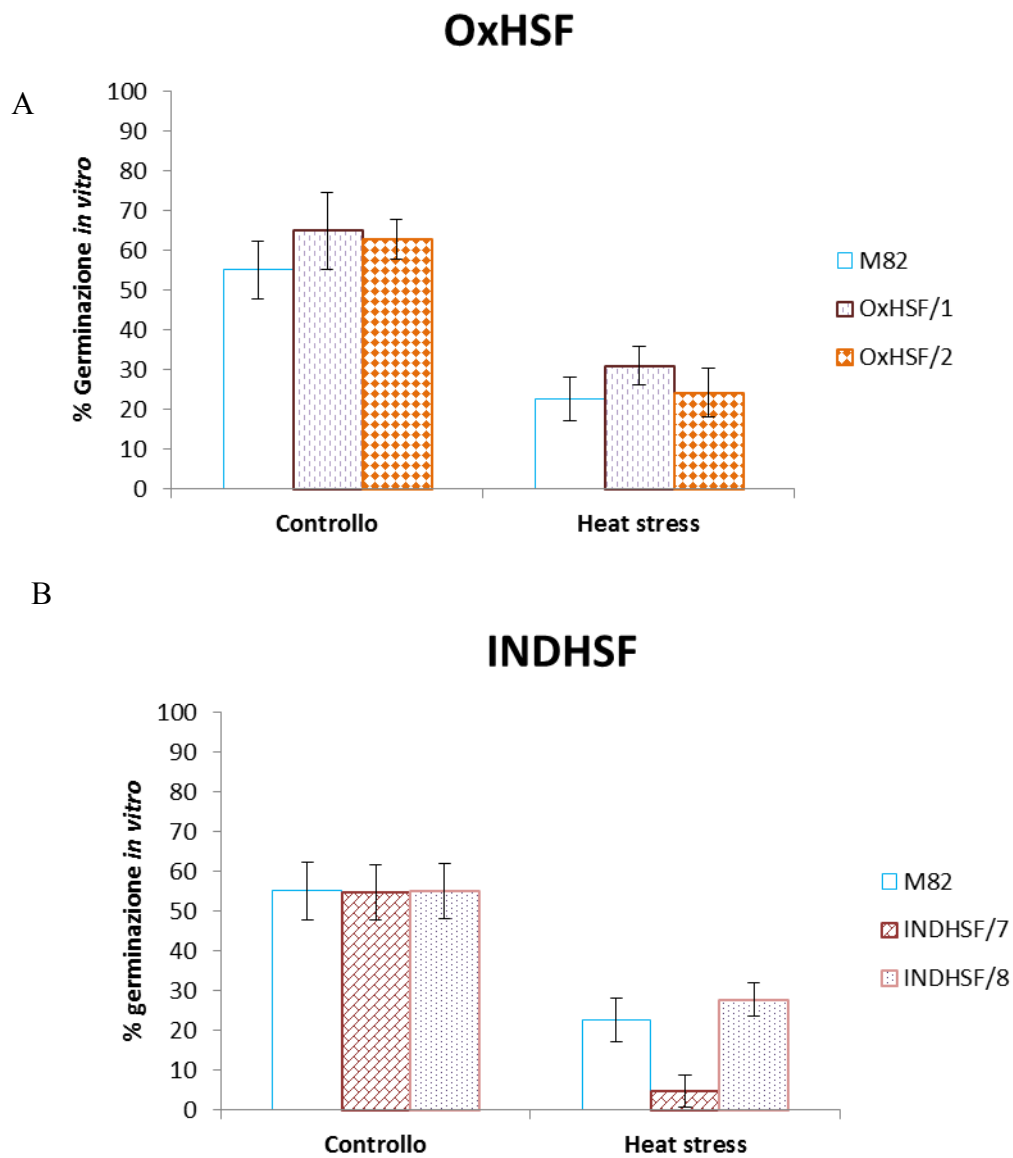


Figura 38 Analisi della germinazione *in vitro* dei granuli pollinici di pomodoro. Sono stati analizzati i granuli pollinici prelevati da antere di 10 mm di piante allevate in condizioni di temperature controllo e di alte temperature (heat stress) del genotipo cv M82 e delle piante trasformate (linee OxHSF/1 e Ox17.6/2) (A) e INDHSF (linee IND17.6/7 e IND17.6/8) (B).

4. Discussione

4.1 Risposta a segnali di stress ambientali e sviluppo di produzioni sostenibili di pomodoro

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) rappresenta una delle colture ortive più importanti ed è oggi una delle specie vegetali più studiate a livello genetico e genomico, non solo a causa della sua notevole importanza economica, ma anche perché possiede un genoma relativamente piccolo (950Mb) e oggi completamente sequenziato (*The tomato genome consortium*; Todd *et al.*, 2012), che contribuisce a farne un sistema modello anche per altre specie in generale e per tutta la famiglia delle Solanacee in particolare.

Il miglioramento genetico del pomodoro ha prodotto sin ora risultati di successo, al fine di ottenere varietà migliorate in grado di soddisfare i bisogni dei coltivatori, dell'industria di conservazione e dei consumatori. Ulteriori successi sono previsti anche come ricaduta degli approcci di genomica recentemente sviluppati che hanno già oggi un forte impatto sul miglioramento genetico del pomodoro, soprattutto per caratteri complessi. Attualmente, visti i cambiamenti climatici globali che interessano il nostro pianeta, è necessario spostare l'attenzione verso nuovi caratteri d'interesse per il miglioramento genetico del pomodoro; tra questi, lo studio delle basi genetiche dell'adattamento alle avversità ambientali è di sempre maggiore interesse da parte della comunità scientifica. Infatti, nel prossimo futuro sono previste una diminuzione delle riserve di cibo disponibile, un aumento delle temperature e una minore disponibilità di risorse idriche. A ciò si aggiunga che le piante, sia in sistemi naturali che in quelli agricoli, sono spesso sottoposte a stress abiotici come le temperature estreme, la scarsa disponibilità di acqua, l'elevata salinità, la carenza di minerali e la presenza di sostanze tossiche nel suolo. Si stima che nei diversi sistemi di coltivazione in tutto il mondo, gli stress abiotici sono in grado di ridurre la produzione di oltre la metà rispetto a quella possibile in condizioni di crescita ideali. Tra i vari stress abiotici, la siccità e le alte temperature sono i due principali fattori ambientali che influenzano la produttività delle piante e la loro distribuzione sul territorio.

Comprendere i meccanismi di tolleranza delle piante alla siccità e alle alte temperature, è di fondamentale importanza per sviluppare strategie volte a ottenere colture in grado di adattarsi alle avversità ambientali. Lo sviluppo di colture con una maggiore tolleranza alla siccità richiede la conoscenza dei meccanismi fisiologici e genetici che contribuiscono al controllo delle caratteristiche delle piante a diversi stadi di sviluppo; mentre lo sviluppo di colture con un maggiore carattere di termo-tolleranza richiede una maggiore comprensione dei meccanismi

molecolari che avvengono nei tessuti riproduttivi durante lo sviluppo degli organi riproduttivi e l'allegagione che come accennato sono fasi estremamente sensibili alle alte temperature.

4.2 Meccanismi fisiologici e molecolari della risposta delle piante a stress idrici di breve e lungo termine

Uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è stato lo studio dei meccanismi molecolari che regolano la risposta fisiologica e biochimica della pianta a ridotti e discontinui apporti idrici. L'ampliamento di tali conoscenze è strategico e funzionale per lo sviluppo di genotipi nuovi e più tolleranti adatti alla produzione in sistemi più sostenibili. Precedenti lavori hanno dimostrato che le piante non accettano passivamente gli stress ambientali ma rispondono attivamente attraverso la percezione dei segnali di stress idrico, con una completa riprogrammazione del metabolismo e dell'espressione di interi set di geni coinvolti nei meccanismi di protezione e riparo dei danni dall'evento di stress (Shinozaki *et al.*, 2007). Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato quindi un approccio integrato per lo studio delle diverse componenti coinvolte nei meccanismi di risposta e tolleranza a stress. Diversi genotipi di pomodoro (con diversa risposta, in termini di tolleranza /susceptibilità a condizioni di ridotto apporto idrico), sono stati quindi caratterizzati da un punto di vista fisiologico, biochimico e molecolare. Le analisi fisiologiche sono state condotte mediante il monitoraggio di diversi parametri quali la conduttanza degli scambi gassosi, l'assimilazione fotosintetica, la resa quantica massima del PSII e il potenziale idrico. La risposta fisiologica è stata correlata ed integrata ai cambiamenti dell'espressione di geni putativamente coinvolti nei meccanismi di tolleranza alla mancanza idrica e alla variazione di parametri biochimici (l'accumulo di prolina libera e i livelli di ABA).

Nel pomodoro coltivato esiste potenzialmente un'ampia variabilità genotipica per la tolleranza alla siccità (Wudiri *et al.*;1985), così come la variabilità che è stata descritta anche nelle specie selvatiche quali *Solanum pennellii* (Corr.) D'Arcy, *Solanum chilense* Dun., *Solanum cheesmanii* Riley, *Solanum pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. e *Solanum esculentum* var. *cerasiforme* (Dun.) Gray (Martin *et al.* 1989; Pillay *et al.* 1990; Richards *et al.* 1979; Rick 1973, 1979, 1982; Yu 1972). Tuttavia, pochi lavori sono stati dedicati alla caratterizzazione fisiologica e/o genetica di tale variabilità in pomodoro (Kahn *et al.* 1993; Martin *et al.* 1999) e quindi questa non è stata utilizzata appieno per lo sviluppo di nuove cultivar tolleranti la siccità. Tutto ciò è in contrasto alla consistente mole di lavori prodotti sulla tolleranza alla siccità di altre specie, come il riso (*Oryza sativa* L.) (Nguyen *et al.* 1997; Zhang *et al.*, 2001), il mais (*Zea mays* L.) (Ribaut *et al.*, 1997), il sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Subudhi *et al.*, 2000) e la lattuga (*Lactuca sativa*

L.) (Johnson *et al.*, 2000). Inoltre, pochi lavori di ricerca sono stati realizzati sulla risposta /tolleranza alla carenza idrica del pomodoro rispetto i lavori effettuati sui meccanismi di risposta di questa specie ad altri tipi di stress abiotici come la salinità e le temperature estreme. Un ulteriore approccio potenzialmente utile e funzionale alla reintroduzione di variabilità genetica per i caratteri di interesse dalle specie selvatiche di pomodoro consiste nell'uso delle linee di introgressione (IL) in cui la variabilità degli alleli selvatici è reintrodotta nella varietà coltivata attraverso la sostituzione di singoli segmenti cromosomici mediante selezione assistita da marcatori molecolari (Zamir, *et al.*, 2001; Giovannoni *et al.*, 2006).

In questo lavoro di tesi, una cultivar sensibile allo stress idrico (M82), sette differenti ecotipi italiani di pomodoro (IT-22/030-1, IT-22/030-2, IT-22/030-3, IT-22/001, IT-22/009, IT-22/007 e IT-22/025) e due linee d'introgressione di *Solanum pennelli* con il genitore ricorrente M82 (IL8.3 e IL9.2.5) sono state sottoposte ad una prova comparativa in un sistema semi-controllato e a due livelli (50 e 100%) di restituzione dell'acqua perduta rispetto per evotraspirazione. La valutazione della produttività e di altri parametri bio-agronomici ha consentito di evidenziare variabilità nella risposta dei diversi genotipi esaminati e di selezionarne alcuni per le successive analisi. In particolare, la riduzione dei parametri bio-agronomici analizzati, ha consentito di verificare la sensibilità della cultivar M82 che è caratterizzata da una drastica riduzione della produzione complessiva. In condizioni di allevamento con ridotta reintegrazione delle perdite d'acqua (50%), la cultivar IT025 ha invece mostrato la massima tolleranza allo stress, mentre la linea IL9.2.5 ha mostrato caratteristiche intermedie di tolleranza. Tale linea di introgressione è di particolare interesse per la presenza di 2 QTL relativi ai solidi solubili nei frutti (Baxter *et al.* 2005; Fridman *et al.*, 2000-2004) nella regione di 9cM del genoma di *S.pennelli* introgresso nel cromosoma 9. Un primo QTL (PW-9-2-5) è responsabile del fenotipo semi-determinato di tale linea d'introgressione, mentre un secondo QTL (Brix 9-2-5) regola l'attività di un'invertasi apoplastica del frutto, LIN5, che è un enzima chiave per determinare il contenuto di solidi solubili in pomodoro ed inoltre la fertilità e il normale sviluppo del frutto (Zanor *et al.* 2009).

Come si accennava sopra, la comprensione dei meccanismi di risposta allo stress idrico e l'identificazione di alleli superiori per il miglioramento genetico del pomodoro richiede un approccio integrato di tipo genomico, metabolomico e fisiologico dove le singole componenti di risposta allo stress siano analizzate e dissezionate. Con tale obiettivo nel lavoro di tesi si sono messi a punto di due sistemi sperimentali di allevamento e imposizione delle condizioni di stress idrico. Attualmente, gran parte delle conoscenze sulla risposta di pomodoro allo stress da ridotta disponibilità idrica è legata a lavori effettuati su giovani plantule (*seedlings*). Tuttavia, lo sviluppo di varietà di piante di pomodoro con caratteristiche di resistenza/tolleranza richiede la

conoscenza dei meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari che contribuiscono allo sviluppo delle piante adulte (ad esempio, allegagione del frutto). Nel sistema sperimentale adottato nel presente lavoro, piante di tre genotipi di pomodoro (M82, IL9.2.5 e IT025), caratterizzati in termini di tolleranza/suscettibilità sono state allevate in vaso e lo stress idrico è stato imposto mediante l'interruzione dell'irrigazione per un gruppo di piante, seguito da un periodo di *recovery* con normale irrigazione e un secondo periodo di deficit idrico. Tale sistema sperimentale ha consentito di mimare, in un ambiente semi-controllato come quello della serra, le condizioni di campo dove sempre più frequentemente durante la coltivazione si alternano periodi caratterizzati da prolungata siccità a brevi periodi di disponibilità idrica. Tuttavia, gli studi dei meccanismi di risposta allo stress idrico seguito da una fase di recupero mediante *rewatering* sono ancora pochi e agli esordi anche se la problematica è di estremo interesse; infatti è atteso che la capacità di recupero della pianta dopo periodi di stress idrico sia un importante fattore di tolleranza, le cui basi genetiche sono ancora in gran parte da definire. Il recupero dei parametri fisiologici, biochimici e molecolari dipende sia dall'intensità/durata dello stress idrico sia dalle caratteristiche di tolleranza delle coltivazioni. Un recente studio di analisi comparativa del trascrittoma di tre cultivar di mais, caratterizzate da un diverso grado di tolleranza/resistenza alla siccità, ha rilevato che le maggiori differenze nella risposta molecolare al termine della fase di recupero. Ciò indica che i genotipi tolleranti attivano differenti ed più efficienti meccanismi molecolari per un maggior recupero dopo un severo stress idrico (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2009).

La risposta e la tolleranza allo stress idrico sono controllati da caratteri estremamente complessi regolati da numerose componenti ambientali. Nello studio degli stress abiotici, la regolazione della pressione osmotica del suolo è difficile o talvolta impossibile da realizzare a causa di diversi fattori come l'interferenza di composti chimici e le proprietà fisiche dei suoli stessi, pertanto la metodologia del sistema idroponica è unica in questi casi (Szira *et al.* 2008). Infatti il sistema di allevamento fuori suolo come l'idroponica può aiutare a comprendere i meccanismi coinvolti nella risposta agli stress abiotici, essendo un ottimo sistema per poter analizzare a livello fisiologico, morfologico e molecolare l'apparato radicale (Mohsenzadeh *et al.* 2009).

I cambiamenti dell'espressione genica in risposta a condizioni di stress idrico causano una serie di alterazioni fisiologiche e biochimiche. La fotosintesi è significativamente influenzata dallo stress idrico, che riduce la normale funzione di altri *pathway* metabolici, come la fissazione dell'azoto (Chaves *et al.*, 2009). Il *pathway* della respirazione, che prevede la scissione delle molecole complesse in composti semplici per provvedere all'energia richiesta per lo sviluppo

della pianta, è accelerato sotto condizioni di stress idrico (Haupt-Herting *et al.*, 2001). Anche i sistemi di protezione, come il *pathway* antiossidante, che protegge le cellule vegetali grazie alla produzione dei difensori dai ROS (*Reactive Oxygen Species*), sono fortemente influenzati da condizioni di stress idrico (Apel *et al.*, 2004).

Nel lavoro di tesi, l'analisi fisiologica ha mostrato che i parametri di risposta allo stress idrico in pomodoro sono drasticamente diminuiti per tutti i genotipi quando il contenuto d'umidità relativa del suolo è fortemente ridotto. Le condizioni di stress idrico severe sono state confermate dalla drastica riduzione della conduttanza stomatica (g_s). La chiusura stomatica è tra le prime risposte allo stress idrico che consente di proteggere le piante dalla perdita eccessiva d'acqua, che potrebbe causare la disidratazione cellulare, la cavitazione nello xilema e la morte della pianta stessa. La chiusura degli stomi è stata correlata per due dei tre genotipi analizzati ad un forte accumulo di acido abscissico. La cultivar sensibile allo stress idrico (M82) mostra una più rapida chiusura stomatica rispetto agli altri genotipi. Quando è stata ripresa l'irrigazione, al termine del *recovery* i valori di g_s sono ritornati confrontabili con quelli delle piante controllo. Parallelamente, è stato analizzato l'andamento dell'assimilazione fotosintetica che si riduce drasticamente in entrambi i cicli di stress idrico in tutti i genotipi di pomodoro. Al termine della fase di *rewatering*, l'assimilazione fotosintetica è stata completamente recuperata. Pertanto è stata osservata una stretta correlazione tra chiusura/apertura stomatica ed inibizione fotosintetica. Questo parametro risulta controllato soltanto dalla chiusura stomatica (Chaves *et al.*, 1991, Chronic *et al.*; 2000) nelle condizioni sperimentali adottate e non da un danno permanente del macchinario fotosintetico. L'analisi della fluorescenza massima del fotosistema 2 indica infatti che le condizioni sperimentali di stress idrico anche se severe, imposte sia in vivo sia in allevamento fuori suolo, non promuovono la foto-inibizione dal momento che sia le piante stressate che quelle controllo presentano valori elevati di F_v/F_m . La riduzione dell'assimilazione fotosintetica non è limitata dal rifornimento di prodotti fotochimici. L'eccesso di energia dovuta alla riduzione del metabolismo del carbonio fotosintetico potrebbe essere dissipata mediante calore attraverso il *quenching* fotochimico. Le piante sottoposte allo stress idrico hanno diversi sistemi di difesa e protezione del proprio macchinario enzimatico. Infatti nei genotipi analizzati sono stati riscontrati elevati livelli di prolina libera. Anche in *Petunia x hybrida* è stata osservata una riduzione dei parametri fisiologici come la conduttanza stomatica, l'assimilazione fotosintetica e il potenziale idrico fogliare in stretta correlazione con i valori di umidità relativa del suolo (Kim *et al.* 2012). I risultati in petunia confermano inoltre che la risposta alla siccità varia in funzione della severità dello stress idrico imposto e che questo è correlato alle variazioni dei valori di umidità relativa del terreno.

La comprensione dei meccanismi biochimici e molecolari nella risposta adattativa allo stress idrico in pomodoro può essere utilizzata come uno strumento per il miglioramento genetico di tale coltivazione per tolleranza allo stress idrico (Gong *et al.*,2010). Tra le nuove potenzialità offerte dagli studi di genomica in pomodoro, una delle strategie più potenti per l'identificazione dei meccanismi di regolazione genetica in fenotipi di interesse è la trascrittomica comparativa, che permette di identificare i profili di espressione di un gran numero di geni su linee e/o trattamenti a confronto. Un interessante studio, mediante la tecnologia microarray, è stato condotto da Gong e collaboratori su giovani plantule di pomodoro della cultivar M82 e di due linee di introgressione di *S. pennelli* con il genitore ricorrente M82, in risposta al ridotto apporto idrico (Gong *et al.*2010). Differenti geni sono stati identificati in risposta a stress idrico nelle linee tolleranti tra cui quelli codificanti per fattori di percezione e di trasduzione del segnale coinvolti nella regolazione globale della risposta allo stress idrico. Numerosi geni che codificano per importanti enzimi implicati in via biosintetiche come quelle della gluconogenesi, della biosintesi delle purine e delle pirimidine, della degradazione del triptofano, della degradazione dell'amido, della biosintesi della metionina e nelle rimozione di radicali liberi sono risultati specificamente regolati nella risposta allo stress idrico in pomodoro. Tuttavia, lo studio e l'analisi della risposta globale del trascrittoma di pomodoro dei tessuti vegetativi in risposta ad un ridotto apporto idrico sono poco esaustivi ed ancora in fase preliminare. Ancora è ben poco nota la risposta di piante adulte in condizioni simili a quelle di campo. Inoltre, la comprensione dei meccanismi di risposta a cicli di stress e di *recovery* è di fondamentale necessità per il miglioramento della gestione colturale coltura del pomodoro. Lo studio integrato in questo lavoro di tesi è stato utilizzato per poter identificare i momenti fisiologici, biochimici e molecolari quanto più prossimi alle reali condizioni di campo per un successivo studio globale della risposta allo stress idrico mediante la tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*) dell'*RNAseq*.

Nel presente lavoro di tesi, sono stati identificati diversi geni come coinvolti nella risposta allo stress idrico mediante ricerca bibliografica, mediante allineamento contro geni noti di *Arabidopsis*, interrogando banche dati come quella del TIGR (The Institute for Genomic Research, www.tigr.org) o SGN (Sol Genomics Network, www.sgn.cornell.edu) e geni omologhi a quelli di patata indotti da stress idrico (20% PEG). L'analisi dell'espressione di 8 geni ha messo in evidenza che l'intensità e la durata delle condizioni di stress idrico in entrambi i sistemi sperimentali, sia *in vivo* che in coltura fuori suolo, influenzano l'espressione genica in una maniera genotipo-specifica e tessuto-specifica.

La risposta allo stress idrico è caratterizzata dalla regolazione di importanti vie metaboliche come ad esempio quello della biosintesi dell'acido abscissico (ABA). In condizioni

di stress idrico l'acido abscissico è coinvolto nella regolazione dell'apertura degli stomi, promuovendone la chiusura e inibendone l'apertura, col fine di ridurre la traspirazione fogliare (Hirayama *et al.*, 2007). Inoltre, l'ABA regola la trascrizione di una moltitudine di geni associati agli stress abiotici. La concentrazione endogena di tale ormone è controllata dalle vie metaboliche coinvolte nella biosintesi e catabolismo dell'ABA nonché dai meccanismi di coniugazione. Un enzima chiave della via biosintetica l'enzima 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi che scinde i composti 9-cis-violaxantina e 9'-cis-neoxantina in xantossina (Nambara *et al.*, 2005) ed è codificato dal gene NCED. I geni *nced* appartengono ad una famiglia multigenica e sono stati identificati in molte specie.

Nel presente lavoro di tesi, l'analisi d'espressione ha evidenziato che a ridotti valori di conduttanza stomatica e di assimilazione fotosintetica è associata la regolazione trascrizionale del gene *nced* sia in piante adulte allevate in vivo che in plantule allevate in coltura idroponica. Nei genotipi sottoposti ad un successivo ciclo d'interruzione dell'irrigazione, preceduto da una fase di *recovery* in cui l'espressione relativa del gene è bassa, si osserva un maggior accumulo del trascritto del gene *nced* facendo ipotizzare un meccanismo di feedback positivo per il genotipo tollerante IT025. In seguito alla drastica riduzione del contenuto in umidità del suolo e della riduzione dei parametri fisiologici, è stato evidenziato un significativo accumulo di ABA in foglie dei genotipi M82 e IT025 al termine del primo ciclo di stress. Una differente risposta della linea IL9.2.5 è stata osservata quando confrontata con gli altri due genotipi a bassi valori di umidità del suolo in entrambi i cicli di stress idrico. In tale genotipo, in corrispondenza di una drastica inibizione dell'attività fotosintetica, è stato evidenziato un accumulo di tale metabolita inferiore. La concentrazione di ABA non è determinata soltanto dalla regolazione della relativa via biosintetica ma anche da quella catabolica. Tale risultato suggerisce che in IL9.2.5, in seguito allo stress idrico, sia regolata la via catabolica dell'ABA. Nelle piante i livelli dell'acido abscissico sono finemente regolati in funzione dei parametri fisiologici. In seguito al completo recupero dell'irrigazione e alla ripresa dell'attività fotosintetica, anche i livelli di ABA ritornano ad essere confrontabili con quelli delle piante controllo. Precedenti ricerche suggeriscono che i valori di g_s sono correlati con la concentrazione dell'ABA xilematica piuttosto che con le concentrazioni fogliari così come osservato in *Petunia x hybrida* (Kim *et al.*, 2012). I risultati ottenuti confermano quindi la forte correlazione tra le variazioni del contenuto in ABA e quelle di conduttanza stomatica e che quindi l'apertura degli stomi stomatica è controllata finemente dalla concentrazione fogliare di ABA.

L'ABA, è fortemente accumulato anche durante brevi e intensi stress idrici nelle foglie di giovani piante di pomodoro allevate in coltura idroponica. La ridotta disponibilità d'acqua, dovuta all'aggiunta di PEG, determina la sovraespressione di *nced* anche in radice. La regolazione della

via biosintetica viene confermata anche a livello biochimico. Nel sito di percezione dello stress idrico, già nelle prime fasi di acclimatamento ad esso, i livelli di ABA incrementano notevolmente rispetto ai valori delle piante di controllo. E' stata inoltre evidenziata una stretta correlazione nelle variazioni di livelli di ABA in foglie e radice. E' ben noto che la produzione di acido abscissico nelle radici e il suo trasporto nel germoglio fornisce le piante di un meccanismo di trasmissione di percezione dello potenziale idrico del suolo (Schachtman *et al.*, 2008).

Molti geni coinvolti nella risposta di difesa mostrano alterazione del profilo d'espressione a ridotti valori di conduttanza stomatica come è il caso del gene *p5cs* coinvolto nella biosintesi della prolina. L'ABA e lo stress salino attivano la trascrizione di questo gene in *Arabidopsis* grazie alla presenza della regione promotrice di sequenze ABREs (Strizhov *et al.*, 1997; Savouré *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 2003). Gli osmoliti compatibili più comunemente accumulati dalle piante sono zuccheri, alcoli, ammine quaternarie, prolina o glicina betaina. La prolina è un aminoacido ciclico, quindi propriamente un iminoacido, non è carico a pH neutro (pI 7) ed è molto solubile in acqua. Tali caratteristiche lo rendono un ottimo soluto compatibile e tra tutti, probabilmente, è quello più diffuso. Oltre a far parte della composizione delle proteine quando è in forma libera svolge il ruolo di osmoprotettore nella cellula. La prolina si accumula anche in eubatteri, protozoi e invertebrati marini in risposta a stress (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Le peculiarità che rendono di particolare interesse la prolina e il suo metabolismo nella fisiologia dello stress risiede nella sua capacità di conferire resistenza a diverse condizioni avverse. L'accumulo di prolina in condizioni di stress osmotico causa un aumento dell'osmolarità della cellula con conseguente richiamo d'acqua o comunque con una riduzione dell'efflusso. Nelle piante superiori, la prolina è sintetizzata prevalentemente a partire da glutammato ma si ritiene possa procedere anche via arginina/ornitina. La P5C sintetasi P5CS (, dotata di attività sia γ -glutamyl-chinasica che glutamil- γ -semialdeide deidrogenasica) rappresenta l'enzima limitante la biosintesi di prolina ed è controllato sia a livello trascrizionale che allosterico mediante inibizione a feed-back (Savouré *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995).

In seguito alla riduzione della conduttanza stomatica e dell'assimilazione fotosintetica, l'espressione del gene *p5cs* viene fortemente incrementata al termine del primo ciclo di stress idrico in tutti i genotipi analizzati. Contrariamente a quanto osservato per *nced*, al termine del secondo ciclo stress idrico non è stato osservato un aumento dei trascritti del messaggero di *p5cs*. Verosimilmente, la trascrizione di questo gene è regolata in fasi precedenti dell'interruzione dell'irrigazione. Al termine del secondo ciclo di deficit idrico, i livelli cellulari dell'enzima potrebbero essere tali da non necessitare l'incremento della trascrizione del messaggero. A livello biochimico, anche al termine del secondo ciclo di stress preceduto da un primo ciclo di interruzione dell'irrigazione e di *rewatering*, la prolina viene fortemente accumulata nei genotipi

M82 e IL9.2.5. Nella cultivar tollerante IT025, invece l'accumulo di questo metabolita risulta inferiore rispetto a quella registrata al diminuire del contenuto d'umidità relativo d'acqua del vaso. Le condizioni drastiche di stress idrico mediate da PEG, inducono un forte accumulo della prolina libera.

Studi precedenti hanno riportato che l'etilene è coinvolto nella risposta allo stress idrico. Questo importante fitormone è implicato nei principali processi di sviluppo, che includono la germinazione, la fioritura, il riempimento dei frutti, la senescenza degli organi e la risposta a vari stress. Numerose evidenze suggeriscono che il controllo della biosintesi dell'etilene sia importante per mediare i processi di sviluppo e la risposta agli stress sia biotici che abiotici. Il precursore dell'etilene è l'amminoacido metionina è l'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC) che serve da intermedio nella conversione della metionina in etilene. L'ultimo passaggio nella biosintesi dell'etilene, la conversione dell'ACC a etilene, è catalizzato dall'enzima ACC ossidasi (ACO). Quando i valori dell'assimilazione fotosintetica e della conduttanza stomatica sono fortemente ridotti nei genotipi M82 e IL9.2.5 è stata osservata l'attivazione della via metabolica coinvolta nella biosintesi dell'etilene in concomitanza all'accumulo di ABA e prolina; tale attivazione è risultata genotipo-specifica. Il genotipo tollerante IT025 infatti non regola in condizioni di ridotto apporto idrico la trascrizione di questo gene. Il *pathway* della biosintesi dell'etilene è regolato anche in giovani piantine di M82 già nelle prime fasi di acclimatamento allo stress.

La risposta del pomodoro alle condizioni sperimentali di stress idrico imposte è caratterizzata anche dalla regolazione di alcune vie metaboliche comuni a tutti i genotipi come ad esempio quella del metabolismo degli zuccheri. Sono stati osservati variazioni per il profilo d'espressione del gene *phosph* coinvolta nella fosforilazione dell'amido sia nelle foglie delle piante allevate in vaso che di quelle allevate in coltura idroponica.

Un gran numero di fattori trascrizionali è stato identificato in numerosi studi di analisi del trascrittoma di pomodoro in risposta a condizioni di stress idrico come responsabili della risposta allo stress sia dei genotipi tolleranti che di quelli sensibili (Gong *et al.* 2010). Uno di questi è *erd15* coinvolto nella trasduzione del segnale di stress. Il gene *erd15* è stato per la prima volta descritto in *Arabidopsis* come indotto dalla disidratazione e codifica per una piccola proteina acida ed idrofila. È stato dimostrato che *erd15* sia un regolatore negativo della trasduzione del segnale dell'ABA. La sovraespressione di *erd15* riduce la sensibilità all'acido abscissico, con l'aumento della tolleranza agli stress abiotici in *Arabidopsis* mediante variazioni del potenziale osmotico, migliorando l'integrità della membrane cellulari e contribuendo ad una maggiore detossificazione dai radicali liberi mentre il suo silenziamento, mediante RNAi, induce ipersensibilità a questo ormone (Murilio *et al.* 2011). L'attivazione di questo fattore

trascrizionale è stata osservata al termine del primo ciclo di stress del genotipo sensibile M82 e nella linea d'introgressione IL9.2.5. I risultati di questo lavoro di tesi hanno dimostrato un accumulo dei trascritti di *erd15* sia in foglie che in radice di piante allevate in coltura fuori suolo così come riportato in piantine di soia allevate in idroponica e sottoposte a stress idrico da PEG, (Murilio *et al.*, 2011).

Le piante fronteggiano allo stress osmotico anche con la regolazione di enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale. In questo lavoro sperimentale, è stata focalizzata l'attenzione su di chinasi appartenete alla famiglia delle MAP chinasi (*mkp1*). Le chinasi sono attivate in risposta alla siccità ed ad altri stress ambientali agendo, in tutte le cellule eucariotiche, come intermediari tra i recettori del segnale a monte e i geni a valle. Un numero sorprendentemente alto di geni codificanti per chinasi di tipo MAPK è stato identificato analizzando il genoma di alcune piante modello, suggerendo che la cascata del segnale attivata dalle MAP chinasi sia un importante componente della trasduzione del segnale. Studi recenti confermano i principali ruoli del *pathway* delle MAP chinasi nello sviluppo, proliferazione cellulare e nella fisiologia ormonale, così come negli stress biotici e abiotici (Nakagami *et al.* 2005). Condizioni di deficit idrico prolungate risultano influenzare l'espressione del gene *mkp1* codificante una fosfatasi coinvolta nella trasduzione del segnale; i livelli dei trascritti *mpk1* risultano dimezzarsi nei genotipi M82 e IL9.2.5 in corrispondenza di un forte accumulo di ABA e di prolina mentre la trascrizione è riattivata in fase di completo recupero fisiologico ed idrico. Regolazione trascrizionale di *mpk1* in piante del genotipo M82, è stata evidenziata anche nelle prime 24 h di stress idrico in coltura idroponica.

L'espressione di numerosi geni è dipendente dall'ABA tra cui i geni che codificano per le proteine *Late embryogenesis abundant* (LEA) implicate nei meccanismi di protezione durante la disidratazione cellulare. Tali geni sono stati identificati non soltanto nei semi ma anche negli organi vegetativi in condizioni di stress abiotici come il freddo, lo stress salino e idrico. Il profilo d'espressione di queste proteine e le caratteristiche strutturali sembrerebbero confermare il ruolo protettivo nella tolleranza allo stress idrico. I risultati d'analisi d'espressione hanno rilevato, sia in vaso sia in condizioni di coltura idroponica, una forte induzione di una proteina Lea, identificata in letteratura mediante analisi del trascrittoma dal gruppo di Gong (Gong *et al* 2010). Tale gene subisce una forte regolazione trascrizionale in tutti i genotipi analizzati e in entrambi i tessuti di pomodoro in corrispondenza di levati accumuli di acido abscissico. La sovraespressione di questo gene è finemente regolata dai bassi valori di conduttanza stomatica ed elevate concentrazioni di ABA, infatti al termine del ciclo di *recovery* il gene non è più sovraespresso.

La risposta di pomodoro al ridotto apporto idrico è caratterizzata anche da una profonda riduzione di alcuni parametri biometrici. Il peso secco dei frutti, delle foglie e delle radici si riducono drasticamente per tutti i genotipi analizzati al termine del ciclo di *stress-recovery-stress*. Anche l'area fogliare totale viene drasticamente ridotta in risposta allo stress idrico. Tali risultati confermano quindi che una delle prime risposte alla riduzione dell'apporto idrico sia la riduzione della crescita vegetativa e della superficie fogliare per ridurre la perdita d'acqua mediante traspirazione.

Il confronto dei risultati ottenuti nei tre genotipi M82, IL9.2.5 e IT025 indica che non sono evidenziabili concrete e significative differenze tra i genotipi. Questo risultato potrebbe essere spiegato considerando l'impossibilità delle piante di poter sviluppare un corretto sviluppo dell'apparato radicale in condizioni di allevamento in vaso. I progenitori selvatici delle piante coltivate tendono ad avere sistemi radicali che possono sfruttare i terreni più imprevedibili e stressanti (Chapin *et al.* 1989). Fondamentale ai fini della risposta complessiva alle condizioni stress sono l'architettura e la portata delle radici; nessuno approfondimento è stato effettuato nella presente tesi allo studio di tale parametri nei genotipi in esame che potrebbero proprio differire nei caratteri distintivi della radice.

Nel complesso i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi, indicano che il pomodoro può adattarsi alle condizioni di stress da ridotto apporto idrico mediante la regolazione di un consistente network di geni coinvolti in vie biosintetiche chiave e nella percezione e trasduzione del segnale in funzione dell'intensità dello stress, in stretta coordinazione con il proprio macchinario fisiologico e biochimico. La risposta del pomodoro è caratterizzata da regolazione del potenziale osmotico mediante accumulo di prolina libera. In seguito a deficit idrico aumentano le concentrazioni dell'acido abscissico coinvolto nella regolazione genica e nella risposta fisiologica di pomodoro. In seguito all'aumento di ABA, si chiudono gli stomi con conseguente diminuzione della conduttanza stomatica ed inibizione dell'assimilazione fotosintetica.

I risultati del presente lavoro di dottorato consentono di ampliare le conoscenze riguardo alla risposta fisiologica, molecolare e biochimica del pomodoro a condizioni di stress idrico e potranno essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi genotipi di pomodoro dotati di maggiore tolleranza allo stress idrico utilizzando programmi innovativi di miglioramento genetico basati sulle conoscenze di genomica strutturale funzionale recentemente sviluppate in questa specie.

4.3 Analisi funzionale di geni coinvolti nella risposta a stress da alte temperature e nei meccanismi di tolleranza in pomodoro

La produttività del pomodoro è negativamente influenzata da condizioni di stress da alte temperature che molto spesso si verificano in campo durante la crescita delle piante e in particolare durante l'allegagione (*fruit-set*) dei frutti. Mentre in pomodoro le basi molecolari della risposta alle alte temperature nei tessuti vegetativi è stata studiata approfonditamente pochissimo è noto sui geni che operano negli organi riproduttivi e che regolano i processi di gametogenesi e fecondazione ad alte temperature. Lo studio di strategie per l'ottenimento di varietà tolleranti lo stress termico è particolarmente difficile perché diverse possono essere le condizioni ambientali e inoltre la risposta a stress dipende da differenti fattori come il genotipo considerato, l'intensità e la durata dello stress termico e lo stadio di sviluppo in cui si trova la pianta di pomodoro al momento dello stress.

Nel presente lavoro, al fine di definire il ruolo funzionale di alcuni geni precedentemente selezionati nella risposta alle alte temperature durante lo sviluppo del fiore e l'allegagione dei frutti, mediante un approccio di *gain of function* sono state sviluppate numerose linee transgeniche di pomodoro (cv M82) sovraesprimenti i geni di interesse. Sono state quindi ottenute piante di *Solanum lycopersicum* cv M82 sovraesprimenti geni codificanti per: - due chaperonine di classe II (Hsp17.6 e Hsp17.4) che assicurano il corretto ripiegamento (*folding*) delle proteine, intervenendo sulla distribuzione intracellulare e nei processi degradativi delle proteine cellulari danneggiate dallo stress; - un recettore di membrana "transforming growth factor-beta" TGF coinvolto nella percezione del segnale; - due chinasi MPK16 e NDPK implicate nella trasduzione del segnale; - un importante fattore trascrizionale HsfA2 coinvolto nella modulazione della risposta allo stress termico in pomodoro, - un componente del fotosistema II, come la proteina Oec. La sovraespressione è stata mediata da un promotore costitutivo e da un promotore inducibile da alte temperature. Il promotore selezionato (LeHsp23.8), come inducibile da stress termico, è quello di un gene di pomodoro (Yi *et al.*, 2006), codificante per una sHSP localizzata nei mitocondri (Shono *et al.*, 2002). In seguito a trattamento da heat shock, l'attività del promotore di LeHsp23.8 è rilevata nelle radici, foglie e frutti. Inoltre durante condizioni di HS il promotore si esprime nei vari tessuti del fiore e durante le varie fasi del suo sviluppo. Nei sepali, nei petali e nello stigma il promotore è attivo in tutte le fasi di sviluppo mentre nelle antere e nel pistillo lo è fino allo stadio di sviluppo unicellulare dei granuli pollinici.

Nel presente lavoro di tesi è stato studiato il ruolo dei geni *hsfA.2* e *hsp17.6* nei meccanismi di risposta a elevate temperature. La sovraespressione costitutiva di *hsp17.6* mediata dal promotore 35S determina nelle foglie e nelle antere una variazione del profilo d'espressione genica causando l'attivazione costitutiva del network genico di pomodoro di risposta allo stress termico

anche in condizioni controllo. In seguito ad un trattamento cronico da heat stress, nelle piante sovraesprimenti *hsp17.6* sono stati osservati elevati livelli dei messaggeri *hsp17.6* sia in foglie che nelle antere per la contemporanea attivazione anche della copia endogena del gene. I dati ottenuti suggeriscono un probabile meccanismo di feedback negativo della regolazione trascrizionale delle due chaperonine. Quando la sovraespressione è invece mediata dal promotore inducibile i dati indicano un probabile meccanismo di silenziamento del gene endogeno e un funzionamento ridotto del promotore. Questa ipotesi è da confermare con ulteriori analisi molecolari. Inoltre, la sovraespressione della chaperonina Hsp17.6 non determina nessuna variazione della germinabilità e della vitalità dei granuli pollinici in nessuna delle linee analizzate sia in condizioni controllo che in condizioni di stress termico. Una maggiore quantità dei messaggeri della chaperonina Hsp17.6 non consentono di superare i danni di uno stress continuo e cronico cui sono state sottoposte le piante di pomodoro. È noto che le alterazioni nelle antere di pomodoro, come ad esempio il fallimento dell'adeguata discesa dello sviluppo del tappeto, sono una diretta conseguenza dello stress termico quando questi avviene nelle prime fasi dello sviluppo del polline, come ad esempio 7-15 giorni prima dell'antesi (Sato *et al.*, 1989). Lo sviluppo di granuli pollinici è estremamente sensibile allo stress da alte temperature, anche se è accompagnato dalla sintesi di diversi tipi di HSP. È stato ipotizzato che la ridotta termotolleranza del polline sia parzialmente attribuibile all'incapacità dei granuli pollinici di modulare una forte risposta allo stress termico dovuta all'impossibilità di produrre grosse quantità di HSP se comparate al tessuto vegetativo. In assenza di stress ambientali, la sintesi delle HSP è limitata durante lo sviluppo degli organi riproduttivi maschili. In particolare, le HSP con basso ed alto peso molecolare sono espresse durante la microsporogenesi, la microgametogenesi e nei granuli pollinici maturi in diverse specie vegetali (Sheoran *et al.*, 2007). Diverse isoforme delle piccole HSP sono in genere abbondanti durante lo sviluppo dei granuli pollinici e sono principalmente espresse durante la meiosi con alti livelli dei loro mRNA durante la fase di tetrad. Contrariamente a quanto osservato in questa fase di sviluppo del polline, le HSP sono assenti nel polline disidratato e sono i geni che le codificano sono solo in minima parte inducibili durante la germinazione. Quest'assenza di una consistente produzione di chaperonine nel polline non è ben chiarita ed è stata in parte associata alla bassa o assente espressione dei geni che codificano per i fattori trascrizionali Hsf. Soltanto per alcuni membri della famiglia dei fattori trascrizionali Hsf in pianta è stato dimostrato la loro regolazione durante lo sviluppo e il loro ruolo nell'attivazione trascrizionale delle HSP.

L'acquisizione della termotolleranza alle alte temperature è un tratto polimorfico che dipende da diversi fattori. L'induzione delle chaperonine HSP mediante il network dei fattori trascrizionali Hsf è un importante meccanismo di regolazione molecolare che contribuisce alla protezione dei

tessuti delle piante (Kotak *et al.*, 2007). A questo scopo nel presente lavoro di tesi, è stata iniziata la caratterizzazione del ruolo funzionale del fattore trascrizionale HsfA2, che potrebbe contribuire a migliorare la tolleranza allo stress termico.

Questo fattore trascrizionale è un attivatore dei geni Hsp ed è probabilmente coinvolto nella regolazione dell'attivazione dei geni Hsp durante lo sviluppo delle polline e delle antere (Nishizawa *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2006; Oyawa *et al.*, 2007). Il fattore trascrizionale HsfA2 è fortemente espresso nelle giovani antere, nello stadio in cui le cellule madri si stanno sviluppando (Brukhin *et al.* (2003). Frank *et al.* (2009) riportano l'espressione di questi geni a uno stadio post meiotico, presumibilmente nelle tetradi, in condizioni di temperatura controllo. Recenti studi suggeriscono che durante lo sviluppo delle microspore nelle linee tolleranti allo stress termico abbiano un maggior livello basale del fattore HsfA2 rispetto a quelle che sono sensibili. Queste evidenze suggeriscono che HsfA2 gene possa contribuire alla termo-tolleranza del polline (Frank *et al.*, 2009). Anche in condizioni di stress termico cronico, nelle piante sovraesprimenti il fattore trascrizionale HsfA2 è stato osservato un forte aumento dei trascritti dei geni coinvolti nei meccanismi di risposta alle alte temperature. La capacità di questo gene di modulare la risposta di pomodoro è stata confermata anche dall'analisi d'espressione delle piante trasformate con il promotore inducibile. Infatti nelle foglie delle piante sovraesprimenti *hsfA2*, è stato osservato una variazione dei livelli d'espressione di un set di geni analizzati. Nelle antere della cultivar M82 e delle linee transgeniche, sia sovraesprimenti *hsp17.6* che *hsfA2*, non è stato osservato l'accumulo del fattore trascrizionale HsfA2 in condizioni di stress termico cronico. È noto da altri studi che il fattore trascrizionale HsfA.2 è attivato in fasi precoci dello sviluppo dei granuli pollinici quando sono ancora immaturi. Giorno *et al* 2010, hanno inoltre dimostrato che in antere allo stadio di 8 mm (precedente a quello considerato in questo lavoro), la trascrizione di *hsfA.2* aumenta rapidamente nelle prime due ore d'esposizione allo stress per poi ridursi nelle ore successive. Si può ipotizzare che nelle condizioni sperimentali adottate, in cui le antere sono state prelevate al primo giorno di antesi (allo stadio di 10 mm) il gene codificante per il fattore trascrizionale HsfA2 non sia più regolato e che la proteina sia stata rimossa già dal citoplasma. Infatti, nelle antere delle linee transgeniche OxHSF si osserva un maggiore accumulo di HSP17.4. Tale gene codifica per una proteina di 155 aminoacidi (N° Swissprot AA C36312) della famiglia delle heat shock protein non ancora ben caratterizzata in pomodoro. Port *et al.* (2004) hanno dimostrato che Hsp17.4 agisce come uno specifico repressore dell'attività di HsfA2 formando un complesso macromolecolare con questo.

Nonostante che la sovraespressione di *hsfA2* determini una variazione del profilo d'espressione di numerosi geni, la germinabilità e la vitalità del polline si riducono drasticamente in condizioni di stress termico in gran parte delle linee osservate così come osservato per la cultivar M82. In

una delle due linee transgeniche in cui la sovraespressione di *hsfA2* è mediata dal promotore inducibile leHsp23.8, l'analisi della germinazione *in vitro* evidenzia una forte riduzione della vitalità e della germinabilità. In questa linea è stata osservata una forte riduzione del numero fiori (dato non mostrato) e dei granuli pollinici totali. L'attivazione del promotore nelle fasi precoci dello sviluppo delle antere e la conseguente attivazione del network genico di risposta causerebbe danni irreversibile allo sviluppo florale e alla germinazione dei pochi granuli maturi. E' noto comunque che la sovrapproduzione delle chaperonine Hsp può anche interferire con il normale processo di sviluppo, come è stato dimostrato in piante di mais che presentano delle mutazioni per il gene *Empty Pericarp2*. Questo gene è normalmente un regolatore negativo della risposta allo shock termico, ma quando non è biologicamente attivo in seguito ad un evento mutazionale, si è osservato un aumento degli aborti fiorali e un rallentamento dell'embriogenesi (Fu *et al.*, 2002).

In conclusione In questo lavoro di tesi è stata iniziata la caratterizzazione funzionale dei geni *hsp17.6* e *hsfA2* due importanti componenti nella risposta molecolare allo stress termico. La loro sovraespressione determina una variazione del profilo d'espressione molecolare nei tessuti analizzati. Successive analisi dovranno essere condotte per la miglior definizione del ruolo funzionale dei geni in esame.

5 Conclusioni

L'obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato lo studio delle basi genetiche e molecolari della risposta di tolleranza della pianta di pomodoro agli stress da ridotto apporto idrico e da alte temperature. Le attività di ricerca svolte e risultati ottenuti hanno consentito :

- La valutazione bio-agronomica comparativa di diversi genotipi di pomodoro in condizioni di ridotta disponibilità idrica con l'identificazione di genotipi con differente suscettibilità/tolleranza a condizioni di carenza idrica;
- la messa a punto di due sistemi sperimentali per l'allevamento di differenti genotipi di pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico, sia in vaso che fuori suolo (coltura idroponica) per un'accurata fenotipizzazione e integrazione di parametri fisiologici, biochimici e molecolari;
- uno studio dettagliato ed integrato della complessa risposta della pianta di pomodoro a condizioni di stress idrico. In particolare: - sono stati identificati parametri fisiologici (assimilazione fotosintetica, conduttanza stomatica e potenziale idrico) e biochimici (accumulo di ABA e prolina) le cui variazioni in condizioni di stress sono correlate a modificazioni dell'espressione genotipo-specifica di un set di geni selezionati la cui attivazione è strettamente dipendente dall'intensità e dalla durata dello stress imposto e coinvolge anche geni espressi nelle radici, sito primario di percezione del segnale di stress; - è stato evidenziato un effetto di *priming* del primo ciclo di stress sull'espressione di un gene coinvolto nella biosintesi dell'ormone ABA (*nced*) mentre un meccanismo di regolazione mediato da *feedback* negativo è riscontrato nella regolazione dell'espressione dei geni *aco*, *p5cs* e di *erd15*; – le condizioni di stress inducono un forte accumulo di ABA e di prolina libera, confermando il ruolo chiave di questo fitormone come mediatore della complessa risposta molecolare a condizioni di stress idrico e che la prolina è un importante effettore del mantenimento del turgore cellulare in condizioni di bassi livelli di potenziale idrico imposti dallo stress, per garantire i processi fisiologici essenziali quali la fotosintesi e altre attività enzimatiche.
- L'ottenimento di numerose linee transgeniche a partire da 13 costrutti genici per la sovraespressione dei geni di pomodoro coinvolti nei meccanismi di tolleranza agli stress termici. Tale materiale transgenico consentirà di definire il ruolo funzionale dei geni *hsp17.6*, *hsp17.4*, *ndpk*, *mpk16*, *oec* e *tgf* nella risposta di pomodoro allo stress termico durante lo sviluppo del fiore e l'allegagione dei frutti.

- Una preliminare analisi funzionale fisiologica e molecolare del ruolo dei geni *hsfA2* e *hsp17.6* nella risposta a stress cronico da alte temperature, condizioni che inducono un forte calo della vitalità e germinabilità del polline confermando che le antere sono un sito di danno particolarmente sensibile allo stress imposto. La sovraespressione dei geni *hsfA2* e *hsp17.6* determina una consistente rimodulazione costitutiva dell'espressione in foglie e antere di alcuni membri del network di risposta alle condizioni di HS cronico. Tale rimodulazione nelle condizioni testate non influenza in modo significativo la vitalità e la germinabilità del polline. .

I risultati ottenuti potranno essere integrati e discussi per una maggiore comprensione dei meccanismi di risposta agli stress e per l'identificazione di alleli utili per la migliorare la sostenibilità del pomodoro in condizioni di ridotto apporto idrico e di stress termico.

Bibliografia

Alba R., Fei Z., Payton P., Liu Y., Moore S. L., Debbie P., Cohn J., D'Ascenzo M., Gordon J. S., Rose J. K. C., Martin G., Tanksley S. D., Bouzayen M., Jahn M. M., Giovannoni J. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: Tools for dissecting plant physiology and development. *Plant Journal* 2004 39: 697-714.

Alba R., Payton P., Fei Z., McQuinn R., Debbie P., Martin G. B., Tanksley S. D., Giovannoni J. Transcriptome and Selected Metabolite Analyses Reveal Multiple Points of Ethylene Control during Tomato Fruit Development. *Plant Cell*. 2005 17(11): 2954-2965.

Almoguera C., Jordano J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 1992 19: 781-92.

Alves M. S., Reis P. a B., Dadalto S. P., Faria J. a Q. a., Fontes E. P. B., & Fietto L. G., A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *The Journal of biological chemistry*, 2011 286(22): 20020–30. doi:10.1074/jbc.M111.233494

Ambrosone A., Costa A., Frusciante L., Luigi Monti, Leone A., Grillo S. Unravelling the molecular cues of plant adaptation or survival to water deficit, *Options mediterraneennes*, 2008 A 83 (In Press).

André, R.G.B., Churata-Masca, M.G.C. Water requirement and crop coefficient for processing tomatoes. *Acta Hortic*, 1992 301:165–170.

Apel K., Hirt H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004 55: 373–399.

Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber C., Zielinski D., von Koskull-Döring P.

Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Biosciences*, 2004 29:471-487.

Baradas, M.W. Crop water requirements. Tropical crops. In: **Griffiths J.F.**, Handbook of Agricultural Meteorology. *Oxford University Press*, Oxford, UK, 1994: 189–209.

Bates, B.C., Z.W. Kundzewicz, S. Wu, J.P. Palutikof, Technical Paper of the Intergov. Panel on Climate Change, 2002.

Baxter C.J., Carrari F., Bauke A., Overy S., Hill S.A., Quick P.W., Fernie A.R., Sweetlove L.J. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant and Cell Physiology* 2005 46: 425–437.

Bitá C.E., Zenoni S., Vriezen W.H., Mariani C., Pezzotti M., Gerats T., Temperature stress differentially modulates transcription in meiotic anthers of heat-tolerant and heat-sensitive tomato plants. *BMC Genomics* 2011 12:384.

Blum, A. Plant Breeding for Water-Limited Environments. *Springer New York*, 2011 New York, NY: doi:10.1007/978-1-4419-7491-4

Bohnert H. J., Qingqiu G., Li P., Ma S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006 9:180–188.

Boss K.P., R.M. Bastow, J.S. Mylne, C. Dean., Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, 2004 16: S18-S31.

Boyer J.S. Plant productivity and environment. *Science*, 1982 218: 443-448.

Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E., Responses to abiotic stresses in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. *American Society of Plant Physiologists*, 2000: 1158–1249

- Brukhin V., Hernould M., Gonzalez N., Chevalier C., Mouras A.**, Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, 2003 15: 311-320.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A.**, Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 2006 125: 443-451.
- Carpenter J. F., Crowe J. H., Arakawa T.**, Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state. *J. Dairy Sci.*, 1990 73: 3627-3636.
- Chapin F.S., Groves R.H., Evans L.T.**, Physiological determinants of growth-rate in response to phosphorus supply in wild and cultivated *Hordeum* species. *Oecologia*, 1989 79: 96-105.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C.**, Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 2009 103: 551-560.
- Chen R., Smith A.G.**, Nucleotide sequence of a stamen- and tapetum- specific gene from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Gene Register*. 101:1413, 1993.
- Chen Q., Vierling E.**, Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein. *Mol Gen Genet*, 1991 2: 228-328.
- Chen T.H., Murata N.**, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2002 5: 250.
- Christiansen M.N.** World environmental limitations to food and fiber culture. In **Christiansen M.N. and Lewis C.F.** Breeding plants for less favourable environments. *Wiley Interscience*, 1982: 1-11.
- Costa A., Massarelli I., Dragonetti E., Leone A., Grillo S.**, Isolation of genes involved in response to osmotic stress. *Proceedings of 14th Triennial Conference of the Europ. Assoc. for Potato Res.*, Sorrento, Italy, 2-7 May 1999, 44-45.
- Costa A., Perrota G., Ambrosone A., Leone A., Grillo S.** Microarray analysis for transcriptional profiling of potato cells under abrupt or gradual-adaptive exposure to water stress. *Proceeding of Interdrought II*, Roma, September 24-28 2005, abstract 6.09.
- Cushman J.C., Bohnert H.J.** Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000, 3:117-124.
- Edlund A.F., R. Swanson, D. Preuss**, Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell*, 2004 16: S84-S97.
- Ellis R.J.**, Chaperone substrates inside the cell. *Trends Biochem Sci*, 2000 25(5): 210-2.
- Eshed Y., Zamir D.**, Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble solids yield of tomato hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 1994 88: 891-897.
- Feder M.E., G.E. Hofmann**, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999 61: 243-282.
- Flowers T.J., A.R. Yeo**, Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *J. Plant Physiol.* 1995, 22: 875-884.
- Forreiter C., M. Kirschner, L. Nover**, Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell.*, 1997 9 (12): 2171-81.
- Frank G, Pressman E, Ophir R, Althan L, Shaked R, Freedman M, Shen S, Firon N.**, Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *Journal of Experimental Botany*, 2009 60: 3891-3908.
- Fray R.G., Wallace A., Grierson D., Lycett G.W.**, Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol. Biol.*, 1994 24: 539-543.

- Fujii H., Chinnusamy V., Rodrigues A., Rubio S., Antoni R., Park S.Y., Cutler S.R., Sheen J., Rodriguez P.L., Zhu J.K.**, In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 2009 462: 66.
- Giovannoni J.**, Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell.*, 2004 16: S170-S180.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Scharf, K.-D., Vriezen, W. H., & Mariani, C.** Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 2010 61(2), 453–462. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2803211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Giorno F., Massarelli I., Barone A., Grandillo S., Alba R.M., Giovannoni J.J., Monti L., Leone A., Grillo S.**, Expression profiling in response to high temperature during tomato flower development. *XLIX SIGA Annual Congress*, Potenza - 12/15 Settembre 2005
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineta O., Thomashow M.F., Zhang J.Z.** 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 130:639-648.
- Hanson B., May D.**, Effect of subsurface drip irrigation on processing tomato yield, water table depth, soil salinity, and profitability. *Agric. Water Manage.* 2004 68: 1–17.0
- Hartl F.U., Hayer-Hartl M.**, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002 Mar 8; 295(5561): 1852-8.
- Hayano-Kanashiro C., Calderòn-Vázquez C., Ibarra-Laclette E., Herrera-Estrella L., Simpson J.**, Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE* 2009 4: 7531.
- Haupt-Herting S., Klug K., Fock H.P.** A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves: gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant Physiology* 2001 126: 388–396.
- Heckathorn S.A., C.A. Downs, T.D. Sharkey, J.S. Coleman**, The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II by heat stress. *Plant Physiol.* 1998 116 (1): 439- 444.
- Heerklotz D., Doring P., Bonzelius F., Winkelhaus S., Nover L.**, The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol Cell Biol* 2001 21(5): 1759-68
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.** Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* 2000 122: 1129-1136.
- Ingram J., Bartels D.**, The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 1996 47: 377-404.
- Johnson P.R., Ecker, J.R.**, The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 1998 32: 227–254.
- Kang J.Y., Choi H.I., Im M.Y., Kim S.Y.**, Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2002 14: 30-57
- Klingler J.P., Batelli G., Zhu J.K.**, ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J. Exp. Bot.* 2010 61: 3199-3210.
- Knight H., Knight M.R.**, Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 2001, 6: 262–267.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.D.**, Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2007 10, 310-316.

Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F., von Koskull-Döring P., Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant J.* 2004 Jul; 39(1): 98-112

Kotak S, Vierling E, Bäumlein H, von Koskull-Döring P. 2007. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 182-195.

Krasensky J., & Jonak C., Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 2012 63(4):1593–608. doi:10.1093/jxb/err460

Lee G.J., N. Pokala, E. Vierling. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea⁷. *J. Biol. Chem.* 270: 10432, **1995**.

Lee J.H., A. Hubel, F. Schoffl, Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Journal.* 1996 8: 603-612.

Leone A., Perrotta C., Maresca B., In Abiotic stresses in plants” Plant tolerance to heat stress: current strategies and new emergent insight”. Edited by Luigi Sanità di Toppi and Barbara Pawlik. 2003 *Skowronska Kluwer Academic Publishers 1*.

Leone A., Costa A., Tucci M., Grillo S., Comparative Analysis of Short- and Long-Term Changes in Gene Expression Caused by Low Water Potential in Potato (*Solanum tuberosum*) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol* 1994 106: 703-712.

Leone A., Costa A., Tucci M., Grillo S., Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum* 1994 92: 21-30.

Leone A., Costa A., Consiglio F., Massarelli I., Dragonetti E., De Palma M., Grillo S., Tolerance to abiotic stresses in potato plants: a molecular approach. *Potato Research*, 1999 42:333-350.

Lippman Z. B., Semel Y., Zamir D., An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genetics & Dev.*, 2007 17: 545-552.

Low D., Brandle K., Nover L., Forreiter C., Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta* 2000 211 (4): 575-82.

Lohmann J. U., Weigel D., Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Dev.Cell.* 2002 2: 135-142.

Malik M. K., Slovin J. P., Hwang C. I., Zimmerman. J. L., Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance”. *Plant J.* 1999 20: 89.

Magome H., Yamaguchi S., Hanada A., Kamiya Y., Oda K. Dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.*, 2004 37:720-729.

Maurel C., Chrispeels M.J., Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, 2001 125:135–138.

Maeda T., Wurgler-Murphy S.M., Saito H., A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 1994 369: 242-245.

Martin B., Nienhuis J., and King G., Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* (Washington, D.C.), 1989 243: 1725–1728.

- Martin B., Tauer C.G., Lin R.K.** Carbon isotope discrimination as a tool to improve water-use efficiency in tomato. *Crop Sci.* 1999 39:1775–1783.
- Massarelli I., Langella R., Giorno F., Barone A., Leone A., Grandillo S., Monti L., Grillo S.**, Repertoire of genes expressed during tomato fruit set at high temperature. *Second EPSON conference "Interactions in Plant Biology: cells, plants and communities.* Ischia (Italia) 10-14 Ottobre 2004.
- McKersie B.D., J. Murnaghan, K.S. Jones, S.R. Bowley.** Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases with increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol* 2000 122 (4): 1427-1437.
- Minorsky P.V.**, Global warming-effects on plants. *Plant Physiol.* 2002 129: 1419
- Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K.D.**, In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development* 2002 16: 1555-1567.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K. Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K.** Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech.*, 1997 15:15-19.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H.**, Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in plant science*, 2005 10(7): 339–46. doi:10.1016/j.tplants.2005.05.009
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K.**, Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiol. Plantar.*, 2006 126: 62-71.
- Nguyen H.T., Babu R.C., and Blum A.**, Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Sci.* 1997 37: 1426–1434
- Nilsson O., I. Lee, M.A. Blazquez, D. Weigel.** Flowering-time genes modulate the response to LEAFY activity. *Genetics.* 1998 150: 403-410.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Yoshida E., Maruta T., Yoshimura K., Shigeoka S.** Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *The Plant Journal* 2006 48: 535–547.
- Nover L. Neumann D. and Scharf K.D.**, Heat shock and other stress response system of plants. *Sprinter*, Berlin (Eds), 1989.
- Nover L., Scharf K.D., Neumann D.**, Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 1989 9:1298-1308.
- Nover L.**, Heat shock response. Boca Raton: CRC Press 1991.
- Nover L., Scharf K.D.**, Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* Jan; 1997 53(1): 80-103.
- Nover L., Bharti K., Doring P., Mishra S.K., Ganguli A., Scharf K.D.**, Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* Jul 2001; 6(3): 177-89
- Port M., Tripp J., Zielinski D., Weber C., Heerklotz D., Winkelhaus S., Bublak D., Scharf K.D.**, Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* 2004 135(3): 1457-70
- Pillay L., Beyl C.**, Early responses of drought-resistant and -susceptible tomato plants subjected to water stress. *J. Plant Growth Regul.* 1990 9: 213–219.
- Pressman E., Peet M.M., Pharr D.M.**, The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in developing anthers. *Annals of Botany* 2002 90: 631-636.

- Ribaut J.M., Jiang C., Gonzalez-de-Leon D., Edmeades G.O., Hosington D.A.**, Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 1997 99: 280-288
- Richards M.A., Phills B.R.** Evaluation of *Lycopersicon* species for drought tolerance. *HortScience*, 1979 14: 121.
- Rick C. M.**, High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. *Hilgardia*, 1974 42:493–510.
- Rick C. M., Tanksley S. D.**, Genetic variation in *Solanum pennellii*: comparison with two other sympatric tomato species. *Plant Systematics and Evolution* 1981 139, 11-45.
- Rick C.M.** ,The role of natural hybridization in the derivation of cultivated tomatoes in western South America. *Econ. Bot.* 1958 12: 346–367.
- Rick C.M.**, Potential genetic resources in tomato species: clues from observation in native habitats. In *Genes, enzymes, and populations. A.M. Srb. Plenum Press, New York, N.Y.* 1973, 255–269.
- Romero C., Belles J.L., Vaja J.L., Serrano R, Culianez-Marcia F.A.**. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 1997 201:293-297.
- Rousseaux M. C., Jones C. M., Adams D., Chetelat R., Bennett A., Powel A.** QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theor. Appl. Genet.*, 2005 111: 1396-1408
- Rudich J., E. Zamski, Y. Regev.** Genotype variation for sensitivity to high temperature in the tomato: pollination and fruit set. *Botanical Gazette.* 1977 138 (4):448-452
- Samach A., D. Hareven, T. Gutfinger, S. Ken-Dror, E. Lifschitz,** Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and up regulation in floral organs. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991 88: 2678-2682,.
- Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer S., Yanofsky M.F., Coupland G.**, Distinct roles of COSTANTS target genes in reproductive development in Arabidopsis". *Science* 2000 288: 1613-1616,.
- Sang-Youl Park,1* Pauline Fung,2* Noriyuki Nishimura,4† Davin R. Jensen,8† Hiroaki Fujii,1 Yang Zhao,2 Shelley Lumba,2 Julia Santiago,5 Americo Rodrigues,5 Tsz-fung F. Chow,2 Simon E. Alfred,2 Dario Bonetta,6 Ruth Finkelstein,7 Nicholas J. Provart,2,3 Darrell Desveaux,2,3 Pedro L. Rodriguez,5 Peter McCourt,2 Jian-Kang Zhu,1 Julian I. Schroeder,4 Brian F. Volkman,8 Sean R. Cutler** Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 2009 324: 1068.
- Scharf K.D., Heider H., Höhfeld I., Lyck R., Schmidt E., Nover L.**, The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Molecular and Cellular Biology* 1998 18: 2240-2251.
- Schoffl F., Prandl R., Reindl A.**, Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.*, 1998 Aug; 117(4): 1135-4.
- Schramm F., Ganguli A. , Kiehlmann E., Englich G. , Walch D., von Koskull-Döring P.** The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 2006 60: 759–772.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G.**, Stamen structure and function. *Plant Cell.* 2004 16: S46-S60.
- Seki M., Satou M., Sakurai T., Akiyama K., Iida K., Ishida J., Nakajima M., Enju A., Narusaka M., Fujita M., Oono Y., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.**, RIKEN Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications forexpression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 2004 55:213-223.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J.**, Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.*, 1997 113:1177-1183.
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, Sawhney VK.** Proteomic analysis of tomato, (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *Journal of Experimental Botany* 2007 58: 3525–3535.

- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.,** Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, 1997 115: 327-334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.,** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2000 3: 217-223
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.,** OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 2003 33: 751-763.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 410-417.
- Shinozaki K.,** RIKEN Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications forexpression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 2004, 55:213-223.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 2007 58: 221–227.
- Skinner D., Hill T.A., Gasser C.S.,** Regulation of ovule development. *Plant Cell.* 2004 16: S32-S45.
- Subudhi P.K., Rosenow D.T., Nguyen H.T.,** Quantitative trait loci for the stay green trait in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): consistency across genetic backgrounds and environments. *Theor. Appl. Genet.* 2000 101: 733–741.
- Tena G, T. Asai, W.L. Chiu, J. Sheen.** Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol.* 2001 4 (5): 392-400.
- Torok Z., I. Horvarth, P. Goloubimoff, E. Kovacs, A. Glats, G. Balogh,** Evidence for a lipochaperonin association of active protein-folding GroES oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shoch conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA.* 1997 94 (6): 2192-2197.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K.** A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 1999 11:1743-1754.
- Verslues P.E., Bray E.A.** Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J. Exp. Bot.*, 2006 57:201-212.
- Vierling E.,** The role of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 1991 42: 579-620
- Vinocur B., Altman A.,** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.*, 2005 16:123-132.
- Zamir D.,** Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet*, 2001 2: 983–989.
- Zegbe J.A., Behboudian M.H., Lang A., Clothier B.E.,** Deficit irrigation and partial rootzone drying maintain fruit dry mass and enhance fruit quality in Petopride processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Sci. Hortic.* 2003 98: 505–510.
- Zhu J.K.,** Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biol* 2001 4: 401-406.
- Zhu J.K.,** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews in Plant Biology*, 2002 53: 247-273.
- Zhu J.K.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003 6:441-445.
- Zhu J.K., Damsz B., Kononowicz A.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** A plant vitronectin like extracellular adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. *Plant Cell*, 1994 6: 393-404.
- Zhu J.K., Shi S., Bressan R.A., Hasegawa P.M.,** Expression of an Atriplex nummularia gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperon Dna J. *Plant Cell*, 1993 5: 341-49.

Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 2003 218:1-14.

Wang Y., Ying J., Kuzma M., Chalifoux M., Sample A., McArthur C., Uchacz T., Sarvas C., Wan J., Dennis D.T., McCourt P., Huang Y. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J.*, 2005 43:413-24.

Wang K.L., Li H., Ecker J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 2002 14 Suppl: S131-151.

Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47: 325-338.

Wudiri B.B., Henderson D.W. Effects of water stress on flowering and fruit set in processing tomatoes. *Sci. Hortic.* 1985 27:189–198.

Xiong L., Zhu J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.*, 2002 25:131–139.

Y. Ma et al., Science 324, 1064 (2009);

Yamada K, Nishimura M. Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3: 660-662.

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso formativo desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla mia crescita professionale ed alla realizzazione del presente lavoro.

Ringrazio, innanzitutto, il Prof. Luigi Frusciante, per avermi concesso la possibilità di svolgere le attività del progetto di dottorato presso l'Istituto di Genetica Vegetale CNR-IGV di Portici.

Ringrazio vivamente Stefania per la sua costante presenza, per il suo sostegno scientifico e morale, ma soprattutto, per avermi trasmesso la tenacia nel perseguire, volta per volta, nuovi obiettivi.

Ringrazio Giorgia, Roberta, Paola ed Antonello per il loro aiuto e per loro amicizia in questi anni di dottorato. Vi ringrazio per aver fatto parte del mio percorso di vita professionale e personale.

Un ringraziamento a tutti gli ex componenti del gruppo stress: Imma, Rossella Alfredo e Teresa.

Ringrazio vivamente il Dott. Pasquale Giorio e la Dott.ssa Rossella Albrizio del CNR-ISAFOM di Ercolano e tutto il loro gruppo di ricerca, per la collaborazione avuta in questi anni e per l'enorme contributo alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

Ringrazio Melania Mistretta e Gianpiero Guida per l'aiuto datomi nelle analisi biochimiche e fisiologiche.

Un particolare ringraziamento a Monica, per avermi "adottato" come suo dottorando.

Come non poter ringraziare tutti i componenti del gruppo RAO: Adele, Daria, Mariangela, Roberta, Irma e Maria per tutti i momenti piacevoli trascorsi assieme.

Un particolar ringraziamento a Peppe per tutte le pause caffè.

Ringrazio tutti i membri della comunità scientifica del castello.

Ringrazio vivamente la mia famiglia per essermi stata vicino ed avermi sempre incoraggiato

Uno speciale ringraziamento va a Paola per il suo preziosissimo ed indispensabile aiuto nella realizzazione dei grafici di questa tesi.

Il lavoro di tesi è stato svolto con la collaborazione del Dr. Pasquale Giorio e la Dott.ssa Rossella Albrizio del CNR- Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFOM) di Ercolano (NA) e del Prof Luigi Ricciardi e della Prof. Concetta Lotti(Università degli studi di Bari, Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale)

Gli esperimenti riportati sono stati effettuati con il supporto finanziario dei seguenti progetti :

- MIUR- Progetto Laboratorio Pubblico-Privato genoPOM (DM17732), OR1, attività 1.1.4 ;
- Regione Campania- misura 214 azione f2, progetto "Salvaguardia della biodiversità vegetale della Campania (SALVE)";
- Ministero Economia e Finanze-Progetto "Innovazione e Sviluppo del Mezzogiorno; Conoscenze Integrate per Sostenibilità ed Innovazione del Made in Italy Agroalimentare" - Legge n. 191/2009", OR 4.1.1;