

## Analisi genetica e molecolare dell'interazione *Pyrus* - *Cacopsylla pyri* per il miglioramento generico del Pero Europeo

Francesca Salvianti<sup>1\*</sup>, Elvio Bellini<sup>1</sup>, Priscilla Paola Bettini<sup>2</sup>, Edgardo Giordani<sup>1</sup> e Patrizia Sacchetti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura, Università di Firenze, viale delle Idee 30, 50019 Sesto Fiorentino (FI)

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, via Romana 17, 50125 Firenze

<sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze, via Maragliano 77, 50144 Firenze

### Genetic and molecular analysis of the *Pyrus* - *Cacopsylla pyri* interaction in European Pear breeding

**Abstract.** The molecular interaction between pear tree and the piercing/sucking insect *Cacopsylla pyri* was investigated through the construction and characterization of cDNA subtracted libraries. Genes expressed upon insect infestation were identified in a susceptible and a resistant pear genotype. The two expression profiles were found to be different: in the resistant plant more genes involved in the response to biotic and abiotic stress were activated than in the susceptible one. The further characterization of the identified genes could lead to the development of molecular markers associated with tolerance/resistance to Psylla.

**Key words:** *Pyrus communis*, *Cacopsylla pyri*, resistance, subtracted library.

### Introduzione

Nel corso dell'evoluzione le piante hanno messo a punto complesse strategie di difesa nei confronti di agenti biotici e abiotici. In particolare, per quanto riguarda gli insetti fitofagi, tali meccanismi difensivi possono essere diretti (antixenosi e antibiosi) o indiretti, costitutivi o indotti.

I fitofagi si dividono in due grandi categorie: insetti con apparato boccale masticatore ed insetti con apparato boccale pungente/succhiante (o fitomizi). I primi danneggiano estesamente i tessuti scatenando una risposta che porta a sintesi di inibitori delle proteasi che interferiscono con la digestione del fitofago. I fitomizi, invece, provocano una risposta molto simile a quella che si ha in presenza di microrganismi patogeni attivando due cascate di trasduzione del segnale, controllate rispettivamente dall'acido salicili-

co e dall'acido jasmonico ed etilene. La prima porta a sintesi di PR proteine (*Pathogenesis Related proteins*) coinvolte in antixenosi e antibiosi e ad una reazione sistemica detta "Resistenza Sistemica Acquisita" (*Systemic Acquired Resistance* - SAR); la seconda conduce alla sintesi di altre PR proteine e ad un altro tipo di reazione sistemica chiamata "Resistenza Sistemica Indotta" (*Induced Systemic Resistance* - ISR) (Walling, 2000). I dati riguardanti i fitomizi sono ancora scarsi in letteratura e si sa poco sugli effetti che l'attacco da parte di tali insetti ha sull'espressione genica della pianta (Yuan *et al.*, 2005).

L'obiettivo di questo lavoro è individuare i geni coinvolti nella risposta del pero (genere *Pyrus*) all'attacco da parte della psilla (*Cacopsylla pyri* L.), un insetto con apparato boccale pungente/succhiante che arreca gravi danni, diretti e indiretti, alla pianta. Sebbene le conseguenze delle infestazioni di psilla siano estremamente dannose per la pericoltura negli Stati Uniti ed in Europa, il sistema *Pyrus-Cacopsylla pyri* non è stato ancora molto studiato. Soprattutto sono assenti in letteratura ricerche sulla genetica molecolare dell'interazione fra questo parassita ed il suo ospite.

### Materiali e metodi

La strategia adottata ha previsto uno studio dell'espressione genica in seguito all'attacco da parte dell'insetto mediante il confronto tra la reazione di una pianta suscettibile e quella di una resistente. Si è scelto di lavorare su piante micropropagate *in vitro* per avere un sistema sperimentale controllabile e ridurre al minimo le possibili variabili. La tecnica prescelta per questo studio è l'"ibridazione sottrattiva" (*Suppression Subtractive Hybridization* o SSH), che permette di confrontare due popolazioni di mRNA e identificare i geni che sono espressi in una popolazione e non nell'altra. Per l'ibridazione sottrattiva ci siamo serviti del "PCR-Select Subtraction Kit" (BD Biosciences Clontech), che propone un protocollo basato sulla PCR, più semplice rispetto alle tecniche

\* francesca.salvianti@unifi.it

tradizionali. La tecnica è brevemente descritta in figura 1.

L'esperimento ha previsto l'infestazione di piante geneticamente identiche con individui di psilla in vari stadi giovanili e l'uso di altrettante piantine come controllo. Dopo 60 ore gli insetti sono stati rimossi, dai due gruppi di piante è stato estratto l'RNA totale e sintetizzato il cDNA corrispondente tramite PCR con primer con sequenza "poli-T". I due cDNA sono stati sottoposti a ibridazione sottrattiva ed è stata ottenuta una popolazione di cDNA corrispondenti ai geni pre-

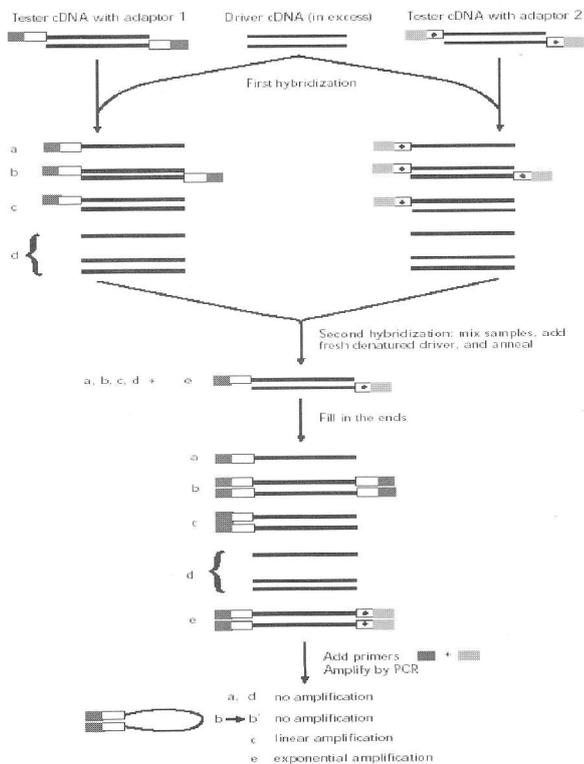


Fig. 1 - Descrizione schematica della tecnica di *Suppression Subtractive Hybridization*. Si sintetizza il cDNA delle due popolazioni a partire dall'RNA totale; si ligano due adattatori diversi al cDNA del campione trattato (tester); si ibridano le due popolazioni di cDNA così ottenute con il cDNA del controllo (driver), privo di adattatori: solo le molecole di cDNA differenzialmente espresse resteranno a singola elica; si fa una seconda ibridazione tra i prodotti della prima ed il cDNA di controllo denaturato: in questo modo le molecole di cDNA differenzialmente espresse possono formare fra di loro ibridi con due diversi adattatori alle estremità. Queste ultime molecole vengono amplificate selettivamente per mezzo di primer specifici per le sequenze degli adattatori (da: Diatchenko *et al.*, 1996).

Fig. 1 - Description of the "Suppression Subtractive Hybridization" technique. The cDNA of both populations is synthesized from the total RNA; two different adapters are ligated to the cDNA of the treated sample (tester); the two cDNA populations are hybridated with the cDNA of the control (driver); without adapters only the molecules of differentially expressed cDNA will remain with a single helix; a second hybridization is made between the products of the first and the denatured control cDNA: hence the molecules of cDNA differentially expressed can form hybrids among them with two different adapters at the ends. These molecules are selectively amplified by specific primers for the sequences of the adapters (from: Diatchenko *et al.*, 1996).

sumibilmente espressi in risposta all'infestazione. Infine, questi cDNA sono stati clonati. Per verificare che i cloni non fossero "falsi positivi", dato che l'efficienza della sottrazione non è mai del 100%, sono state anche fatte ibridazioni di controllo ("dot blot") sui cloni della libreria utilizzando come sonda la popolazione di cDNA driver marcata. Come controllo negativo dell'ibridazione è stato usato il vettore tal quale. È stata infine determinata la sequenza nucleotidica dei cloni differenzialmente espressi. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle di geni noti disponibili nelle banche dati, al fine di individuare omologie, e depositate nella banca dati GenBank.

## Risultati

Inizialmente è stata messa a punto l'ibridazione sottrattiva su pero della cultivar "William", suscettibile alla psilla. Sono stati esaminati 144 cloni dei 218 ottenuti. Fra i geni che mostrano omologia con le sequenze di pero (tab. 1) sono particolarmente interessanti le "NAC domain protein", fattori di trascrizione esclusivi delle piante che vengono espressi in risposta a patogeni, ferite ed insetti; l'arginina decarbossilasi, un enzima chiave della biosintesi delle poliammine (coinvolte nella risposta a stress e a ferite); ed infine la cinnamil alcol deidrogenasi (CAD), un enzima della via biosintetica della lignina.

L'attivazione di questo gene è importante, in quanto la sintesi di lignina è un meccanismo ben noto di risposta ai patogeni e in generale a diversi tipi di stress. Risultano inoltre sovraespressi alcuni geni coinvolti nel metabolismo generale (geni per il fattore di allungamento della traduzione  $1\alpha$ , per la subunità beta della F1 ATP sintasi mitocondriale, per l'arginina metiltransferasi, per tRNA e per la proteina NAM), probabilmente nell'ambito di una riprogrammazione del metabolismo della pianta in seguito all'attacco del fitofago.

Per verificare che i cloni dei quali si era determinata la sequenza nucleotidica corrispondessero realmente a geni differenzialmente espressi, è stato eseguito un "virtual northern blot" in cui il cDNA tester, trasferito su una membrana di nylon, è stato fatto ibridare con due sonde ottenute a partire dai cloni W007 e W021 (codificanti rispettivamente il dominio NAC e la CAD), presi a campione. Le bande di ibridazione ottenute hanno confermato che le sequenze da noi individuate sono effettivamente espresse. Lo stesso protocollo sperimentale è stato applicato sulla selezione di pero "NY10355" resistente alla psilla. Sono stati analizzati 146 cloni dei 317 ottenuti. Le omologie più interessanti riscontrate fra i cloni della libreria e le

Tab. 1 - Omologie fra i cloni della libreria di cDNA e geni disponibili in banca dati.  
 Tab. 1 - Homologies among the clones of the cDNA library and the available genes in the database.

Clone	GenBank accession number	Omologia	E-value*
W006	DV440813	<i>Recchia mexicana</i> <b>tRNA-Leu (trnL) gene</b> , partial sequence; <b>trnL-trnF intergenic spacer</b> , complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence; chloroplast genes for chloroplast products - GenBank Accession Number: AF367009	1.2e-26
W007	DV440814	<i>Glycine max</i> <b>NAC1 protein (NAC1) gene</b> , complete cds.- GenBank Accession Number: AY974349	2.6e-13
W017	DV440816	<i>Arabidopsis thaliana</i> clone RAFL15-05-P20 (R20475) putative <b>arginine methyltransferase (At5g49020)</b> mRNA - GenBank Accession Number: BT002972	1.1e-22
W020	DV440819	<i>P. hybrida</i> mRNA encoding <b>NAM protein</b> - GenBank Accession Number: X92205	8e-07
W021	DV440820	<i>Malus x domestica</i> putative <b>cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)</b> mRNA - GenBank Accession Number: AF053084	1.7e-86
W116	DV440834	<i>Glycine max</i> <b>NAC domain protein NAC1</b> - GenBank Accession Number: AAY46121	9e-23
W126	DV440835	<i>Malus x domestica</i> <b>auxin-repressed protein like-protein</b> mRNA - GenBank Accession Number: AF336307	7.1e-70
W130	DV440836	<i>Cyanophora paradoxa</i> <b>elongation translation factor 1 alpha</b> mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: AF092951	8.1e-54
W137	DV440837	<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for <b>mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit (p_beta gene)</b> - GenBank Accession Number: AJ271468	1e-52
W139	DV440838	<i>Malus x domestica</i> <b>MdADC mRNA for arginine decarboxylase</b> , complete cds. - GenBank Accession Number: AB181854	1.5e-35

\* E-value: misura della probabilità che l'omologia sia casuale; è definito come il numero atteso di sequenze che danno lo stesso score o uno migliore quando il database è testato con una sequenza casuale.

\* E-value: measure of the probability that the homology is due to chance; it is defined as the expected number of sequences which give the same score or a better one when the database is tested with a random sequence.

sequenze disponibili in banca dati sono riportate in tabella 2.

Sulla base dei risultati ottenuti, la selezione di pero resistente alla psilla sembra esprimere molti più geni coinvolti in maniera diretta o indiretta nella risposta di difesa delle piante nei confronti di stress biotici e/o abiotici rispetto alla cultivar suscettibile. Fra questi possiamo segnalare in particolare: una proteina simile alla metalotioneina, proteina nota per essere indotta in risposta a fitomizi, patogeni virali e fungini e ferite; l'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi (HMGR), fondamentale nella biosintesi delle fitoalessine di natura terpenoide; la 1-amminociclopropano-1-carbossilato sintasi (ACC sintasi), enzima chiave della biosintesi dell'etilene che ha un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale nella risposta a patogeni, a ferite e ad insetti; un fattore di trascrizione della famiglia bZIP, che interviene nella trascrizione

di geni di difesa; fattori di trascrizione della famiglia AP2/EREBP (apetala2/Ethylene Response Element Binding Protein), che intervengono in risposta a stress abiotici e a patogeni.

Queste similitudini sono coerenti con i dati presenti in letteratura che indicano molti aspetti comuni fra le risposte ai fitomizi e ai patogeni.

## Conclusioni

Dai risultati scaturiti possiamo affermare che i geni notoriamente coinvolti nella risposta difensiva vengono indotti in seguito all'infestazione da parte dell'insetto sia nella cultivar suscettibile che nella selezione resistente alla psilla. I dati da noi ottenuti evidenziano però una differenza nel pattern di espressione genica fra la pianta resistente e la suscettibile.

Il lavoro prelude allo sviluppo di marcatori mole-

Tab. 2 - Omologie fra i cloni della libreria di cDNA e geni disponibili in banca dati.  
 Tab. 2 - Homologies among the clones of the cDNA library and the available genes in the database.

Clone	GenBank accession number	Omologia	E-value
NY196	DV440798	<i>Antirrhinum majus</i> mRNA for <b>bZIP DNA-binding protein</b> - GenBank Accession Number: Y13676	6.1e-33
NY210	DV440807	<i>Arabidopsis thaliana</i> <b>AAA-type ATPase family protein</b> (At4g28000) mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: NM_118938	2e-08
NY177	DV440784	<i>Arabidopsis thaliana</i> <b>acid phosphatase</b> , putative (At1g14290) mRNA, complete cds - GenBank Accession Number: NM_101295	3e-32
NY111	DV440745	<i>Arabidopsis thaliana</i> <b>Der1-like family protein / degradation in the ER-like family protein</b> (At4g04860) mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: NM_116724	7e-27
NY029	DV440737	<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for <b>mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit (p_beta gene)</b> - GenBank Accession Number: ATH271468	2e-130
NY121	DV440752	<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for <b>SC35-like splicing factor SCL33</b> , 33 kD - GenBank Accession Number: AJ293799	8.5e-19
NY185	DV440791	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative <b>AP2/EREBP transcription factor</b> - GenBank Accession Number: AAT44944	6e-09
NY198	DV440800	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative <b>Col-0 casein kinase I</b> (At4g26100) mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: AY050784	3.5e-13
NY134	DV440761	<i>Euphorbia esula</i> <b>LMW heat shock protein</b> mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: AF237957	2.9e-08
NY109	DV440744	<i>Hordeum vulgare</i> putative <b>calmodulin binding transporter protein</b> - GenBank Accession Number: CAA05637	1e-05
NY183	DV440789	<i>Malus x domestica</i> <b>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS1) gene</b> , ACS1-1 allele, promoter region and partial cds. - GenBank Accession Number: AY062129	1.6e-20
NY103	DV440739	<i>Malus x domestica</i> <b>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMGR) gene</b> , promoter region and partial cds. - GenBank Accession Number: AF495909	7e-06
NY172	DV644003	<i>Medicago sativa</i> mRNA for <b>protein phosphatase 1, beta subunit</b> - GenBank Accession Number: AJ002485	4e-84
NY146	DV440769	<i>Medicago sativa</i> mRNA for <b>protein phosphatase 1, delta subunit</b> - GenBank Accession Number: AJ002487	1.1e-14
NY013	DV440735	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) <b>Cgi67 serine protease-like</b> - GenBank Accession Number: BAD37810	7e-22
NY151	DV440771	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) putative <b>beta-amylase</b> - GenBank Accession Number: BAD46222	2e-23
NY115	DV440747	<i>Populus alba</i> putative <b>DREB2-like protein</b> mRNA, isolate 1. - GenBank Accession Number: AJ833632	2e-27
NY178	DV440785	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i> <b>retinoblastoma-related protein 1 (RB1)</b> mRNA, complete cds. - GenBank Accession Number: AF133675	1.2e-09
NY102	DV440738	<i>Populus x canadensis</i> mRNA for putative <b>histidine-containing phosphotransfer protein 2 (hpt2 gene)</b> , cultivar Dorskamp - GenBank Accession Number: AJ841794	1e-77
NY117	DV440749	<i>Pyrus pyrifolia</i> gene for <b>S3-RNase</b> , complete cds. AB025421	1.4e-25
NY027	DV440736	<i>Pyrus pyrifolia</i> PFRU8 mRNA for <b>metallothionein-like protein</b> - GenBank Accession Number: AB021785	2.4e-81
NY141	DV440765	<i>Pyrus pyrifolia</i> strain Whangkeumbae <b>polypeptide precursor of photosystem II (PP1)</b> mRNA, partial cds. - GenBank Accession Number: AF195209	3e-127

\* E-value: misura della probabilità che l'omologia sia casuale; è definito come il numero atteso di sequenze che danno lo stesso score o uno migliore quando il database è testato con una sequenza casuale.

\* E-value: measure of the probability that the homology is due to chance; it is defined as the expected number of sequences which give the same score or a better one when the database is tested with a random sequence.

colari associati alla resistenza a psilla che siano espressi precocemente e/o in misura maggiore nelle piante tolleranti e resistenti rispetto alle suscettibili.

### Riassunto

L'interazione molecolare tra il pero e l'insetto con apparato boccale pungente/succhiante *Cacopsylla pyri* è stata analizzata mediante la costruzione e caratterizzazione di librerie di cDNA ottenute in seguito a ibridazione sottrattiva. I geni espressi dopo l'attacco dell'insetto sono stati identificati in un genotipo di pero resistente ed uno suscettibile. I due profili di espressione sono risultati diversi: nella pianta resistente più geni coinvolti nella risposta a stress biotici ed abiotici sono stati attivati, rispetto a quanto avvenuto nella pianta suscettibile. L'ulteriore caratterizzazione dei geni identificati potrebbe condurre allo sviluppo di

marcatori molecolari associati alla tolleranza/resistenza alla psilla.

**Parole chiave:** *Pyrus communis*, psilla, analisi sottrattiva.

### Bibliografia

- DIATCHENKO L., LAU Y-F.C., CAMPBELL A. P., MOQADAM F., HUANG B., LUKYANOV S., LUKYANOV K., GURSKAYA N., SVERDLOV E.D., SIEBERT P.D., 1996. *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93: 6025-6030.
- YUAN H., CHEN X., ZHU L., HE G., 2005. *Identification of genes responsive to brown planthopper Nilaparvata lugens Stål (Homoptera: Delphacidae) feeding in rice*. Planta, 221: 105-112.
- WALLING L.L., 2000. *The myriad plant responses to herbivores*. Journal of Plant Growth Regulation, 19: 195-216.