



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE
INDIRIZZO: BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
CICLO XXV**

**STUDIO FUNZIONALE DI DUE GENI MADS-box
(*FaSHP* e *TM8*) COINVOLTI NELLO SVILUPPO DI
STRUTTURE CARNOSE CON FUNZIONE
"FRUTTO"**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Dottoranda: Margherita Daminato

Alla mia famiglia

Indice

| | |
|---|----|
| Abstract | 1 |
| Riassunto | 3 |
| 1. Introduzione | 5 |
| 1.1 Introduzione generale | 5 |
| 1.1.1 Il ruolo dei frutti nella dispersione dei semi..... | 5 |
| 1.1.2 La sindrome di maturazione dei frutti carnosì..... | 7 |
| 1.1.3 La regolazione ormonale della maturazione dei frutti carnosì..... | 10 |
| 1.1.4 La regolazione trascrizionale della maturazione dei frutti carnosì..... | 13 |
| 1.1.5 I geni MADS-box..... | 14 |
| 1.1.6 I geni MADS-box e lo sviluppo dei frutti..... | 19 |
| 1.2 <i>Fragaria x ananassa</i> | 21 |
| 1.2.1 Il frutto di fragola..... | 21 |
| 1.2.2 La sindrome di maturazione del frutto di fragola..... | 21 |
| 1.2.3 La regolazione ormonale della maturazione del frutto di fragola..... | 24 |
| 1.2.4 La regolazione trascrizionale della maturazione del frutto di fragola..... | 26 |
| 1.3 <i>Solanum lycopersicum</i> | 27 |
| 1.3.1 La regolazione trascrizionale della maturazione del frutto di pomodoro..... | 27 |
| 1.3.2 I geni MADS-box di pomodoro..... | 28 |
| 2. Scopo del lavoro | 30 |
| 3. Materiali e Metodi | 31 |
| 3.1 Materiali | 31 |
| 3.1.1 Soluzioni e terreni..... | 31 |
| 3.1.2 Materiale vegetale..... | 32 |
| 3.1.3 Oligonucleotidi..... | 33 |
| 3.2 Metodi | 35 |
| 3.2.1 Estrazione di RNA..... | 35 |
| 3.2.2 Purificazione dell' RNA e sintesi del cDNA..... | 36 |
| 3.2.3 <i>Real time</i> PCR..... | 37 |
| 3.2.4 Estrazione di DNA genomico..... | 38 |
| 3.2.5 Quantificazione degli acidi nucleici..... | 38 |
| 3.2.6 Reazioni di PCR..... | 39 |
| 3.2.7 Purificazione dei prodotti di PCR..... | 40 |
| 3.2.8 <i>Screening</i> di una libreria di cDNA..... | 40 |
| 3.2.9 Trasformazione batterica (<i>Escherichia coli</i>) mediante elettroporazione..... | 42 |
| 3.2.10 Preparazione di DNA plasmidico..... | 42 |
| 3.2.11 Restrizioni enzimatiche..... | 43 |
| 3.2.12 Tecniche di clonaggio..... | 43 |
| 3.2.12.1 Allestimento dei vettori per gli esperimenti di <i>RNA interference</i> | 43 |
| 3.2.12.2 Allestimento dei vettori per gli esperimenti di sovra-espressione..... | 47 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.12.3 Clonaggio del promotore del gene <i>FaSHP</i> | 50 |
| 3.2.13 Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 51 |
| 3.2.14 Trasformazione transiente di frutti di fragola mediante agroinfiltrazione..... | 51 |
| 3.2.15 Trasformazione delle piante di pomodoro..... | 52 |
| 3.2.16 Trattamenti ormonali..... | 52 |
| 3.2.17 Microscopia ESEM..... | 53 |
| 3.2.18 Test di vitalità del polline..... | 53 |
| 3.2.19 Analisi dei pigmenti clorofilliani..... | 54 |
| 3.2.20 Determinazione delle sequenze di DNA ed analisi dedicate..... | 54 |
| 3.2.21 Analisi filogenetica..... | 55 |
| 4. Risultati e Discussione..... | 57 |
| 4.1 Analisi funzionale del gene <i>FaSHP</i> di <i>Fragaria x ananassa</i>..... | 57 |
| 4.1.1 Identificazione ed analisi della sequenza del gene <i>FaSHP</i> | 58 |
| 4.1.2 Analisi di espressione dei geni <i>AGAMOUS-like</i> di fragola: <i>FaSHP</i> e <i>STAG1</i> | 60 |
| 4.1.3 Silenziamento e sovra-espressione transiente del gene <i>FaSHP</i> in frutti di fragola..... | 62 |
| 4.1.4 Analisi di espressione di geni coinvolti nella maturazione di fragola, cultivar <i>Elsanta</i> | 66 |
| 4.1.5 Effetti del silenziamento e della sovra-espressione del gene <i>FaSHP</i> sulla maturazione del frutto: analisi di espressione di geni marcatori..... | 70 |
| 4.1.6 Collocazione del gene <i>FaSHP</i> nel <i>network</i> molecolare che regola la maturazione: analisi di espressione di fattori di trascrizione nei frutti sotto- e sovra-esprimenti <i>FaSHP</i> | 72 |
| 4.1.7 <i>FaSHP</i> e la regolazione ormonale della maturazione del frutto..... | 74 |
| 4.1.8 Conclusioni..... | 78 |
| 4.2 Analisi funzionale del gene <i>TM8</i> di <i>Solanum lycopersicum</i>..... | 82 |
| 4.2.1 Analisi della sequenza ed espressione del gene <i>TM8</i> | 83 |
| 4.2.2 Trasformazione di pomodoro..... | 86 |
| 4.2.2.1 Caratterizzazione fenotipica delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8 (35S:: <i>TM8</i>)..... | 87 |
| 4.2.2.2 Caratterizzazione molecolare delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8 (35S:: <i>TM8</i>)..... | 89 |
| 4.2.2.3 Caratterizzazione fenotipica delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8::SRDX (35S:: <i>TM8</i> ::SRDX)..... | 92 |
| 4.2.2.4 Caratterizzazione molecolare delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8::SRDX (35S:: <i>TM8</i> ::SRDX)..... | 97 |
| 4.2.3 Conclusioni..... | 103 |
| 5. Allegati..... | 106 |
| 5.1 Sequenza <i>FaSHP</i> di <i>Fragaria x ananassa</i> | 106 |
| 5.2 Sequenza <i>TM8</i> di <i>Solanum lycopersicum</i> | 107 |
| 5.3 Sequenza del promotore del gene <i>FaSHP</i> | 108 |
| 6. Bibliografia..... | 109 |

Abstract

The fruit is an ovary derived structure, typical of Angiosperms, that is fundamental for the dispersal of seeds in the environment. Fleshy fruits are particularly efficient because they attract frugivorous animals that disperse the seeds in the environment by means of endozoochory. However the production of fleshy structures for seed dispersal is not limited to flowering plants and can be also found in the Gymnosperms. In fact, some Gymnosperm species surround their seeds with fleshy structures which can be considered fruits from a functional point of view, even if they are not ovary derived. The study of the molecular mechanisms regulating fleshy structure development is therefore interesting from an evolutionary point of view. It was recently discovered that some MADS-box genes, already known to be involved in the development of Angiosperm fruits, are also expressed in Gymnosperm fruits (Lovisetto *et al.*, 2012). This suggests a possible conservation of the molecular mechanisms involved in the development of seed dispersing structures. Since the study of Gymnosperm genes is difficult because these plants are recalcitrant to both transformation and regeneration, we decided to study two Angiosperm genes for this thesis work. In particular the strawberry *FaSHP* and the tomato *TM8* genes, whose homologous ones are also expressed in the Gymnosperm fruits, were studied in strawberry and tomato, respectively.

FaSHP is a strawberry *AGAMOUS*-like MADS-box gene, belonging to the *PLENA* clade, which was isolated following the screening of a red fruit cDNA library and which is particularly expressed during the ripening phase. Considering the already demonstrated important role of other genes of this group during the development of climacteric fleshy fruits, we decided to investigate *FaSHP* function by means of transient gene silencing and over-expression experiments in strawberry fruits, which are non-climacteric. *FaSHP* down- and over-expressing fruits showed respectively a delay and an acceleration of the ripening phase, which were confirmed at the molecular level by means of the altered expression of some ripening related genes. These data led to hypothesize a possible role for *FaSHP* as general regulator of many aspects of the "ripening syndrome" in strawberry. Moreover *FaSHP* gene expression analysis following fruit treatments with auxin and ABA (key hormonal regulators of strawberry ripening), and the identification of hormone response sequences in the gene promoter, suggested that *FaSHP* could at least partially mediate these two hormone role on fruit ripening. Therefore the results of this part of the work suggest that *FaSHP* could be a "master gene" in strawberry fruit ripening. Considering that *AGAMOUS*-like genes are also expressed during the development of Gymnosperm fruits, which like strawberries are false fruits, it can be supposed that the Gymnosperm genes could have a similar function during the development of the seed surrounding fleshy structures of these plants.

TM8 was the first discovered gene of a poorly studied MADS-box gene group. As well as Gymnosperm *TM8*-like genes the tomato *TM8* gene has an ubiquitous gene expression profile, even if it reaches a maximum in the flower. In order to test the gene role we produced transgenic plants over-expressing *TM8* and transgenic plants over-expressing the gene as a chimeric repressor. Since transgenic plants over-expressing *TM8* produce flowers having dialytic stamens, we hypothesized that this gene could have a role in the development of male reproductive organs. This idea was supported by the gene expression analysis of other floral organ MADS-box identity genes. Besides *TM8* possible function during flower development, the phenotypic and molecular analysis of the plants over-expressing *TM8* as a chimeric repressor led to hypothesize a possible function also during the development of other plant organs, both vegetative (leaf) and reproductive (fruit). These roles in several steps of the plant life cycle support the idea that *TM8*-like genes are very ancient and that they originated early during MADS-box gene evolution. Moreover, *TM8* possible function during fruit development suggests that also in Gymnosperms, where *TM8*-like genes are expressed in seed dispersing structures, they could participate in the development of "fruits".

Riassunto

Il frutto, definito in termini botanici come struttura che si sviluppa da un ovario florale in seguito ad un evento di fecondazione, è una struttura peculiare delle Angiosperme. Esso ha contribuito in modo rilevante al successo riproduttivo di queste piante essendo principalmente deputato al processo di dispersione dei semi che si sviluppano al suo interno. Tuttavia, la necessità di disperdere i semi nell'ambiente non è unica delle Angiosperme, anche le Gimnosperme producendo semi devono affrontare questa problematica. Sebbene esse non presentino fiori, e pertanto non siano in grado di produrre veri frutti, vi sono molte specie che circondano i propri semi con delle strutture carnose che hanno lo scopo di facilitarne la dispersione, e sono quindi simili ai veri frutti da un punto di vista funzionale. Alla luce di queste considerazioni risulta chiaro che studiare i meccanismi che regolano lo sviluppo e la maturazione dei frutti è importante anche sotto il profilo evolutivo. Recentemente è stato scoperto che gli omologhi di alcuni geni MADS-box che controllano lo sviluppo e maturazione dei veri frutti, sono espressi anche nelle strutture carnose associate ai semi di alcune Gimnosperme (Lovisetto *et al.*, 2012), suggerendo una possibile conservazione di parte dei meccanismi molecolari di base che regolano la formazione delle strutture coinvolte nella dispersione dei semi. Poiché la caratterizzazione funzionale di tali geni risulta difficile nelle Gimnosperme, per il presente lavoro si è deciso di focalizzare l'attenzione su due geni di Angiosperme, omologhi dei geni identificati nelle Gimnosperme. In particolare è stata condotta la caratterizzazione funzionale del gene *FaSHP* di fragola e del gene *TM8* di pomodoro.

FaSHP è un gene MADS-box, appartenente al clade *PLENA* della sottofamiglia *AGAMOUS*, che è stato isolato mediante lo *screening* di una libreria di cDNA di frutto rosso e che è risultato essere espresso nel frutto con un profilo di espressione maturazione-specifico. Per alcuni geni appartenenti a questa classe è già stato definito un ruolo di regolazione durante la maturazione dei frutti climaterici. Quindi, si è deciso di caratterizzare funzionalmente il gene *FaSHP* conducendo degli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione transiente in frutti di fragola che sono invece non-climaterici. Il rallentamento e l'accelerazione della maturazione riscontrati nei frutti rispettivamente sotto- e sovra-esprimenti il gene, insieme alla modificata espressione di vari geni marcatori del processo di maturazione, suggeriscono che *FaSHP* possa essere uno dei protagonisti del *network* molecolare che regola la maturazione del frutto di fragola. Inoltre, l'analisi di espressione del gene in seguito ai trattamenti ormonali con auxina ed ABA (regolatori chiave per la maturazione di fragola) e l'identificazione nel promotore del gene di segnali di risposta ai due ormoni, hanno indotto ad ipotizzare che *FaSHP* possa fungere, almeno in parte, da mediatore nella regolazione della maturazione da parte di questi fitormoni. I dati ottenuti in questa prima parte del lavoro indicano dunque che

FaSHP possa essere un *master gene* nella maturazione del frutto di fragola. Considerando che i geni *AGAMOUS-like* sono espressi anche durante lo sviluppo delle strutture carnose delle Gimnosperme, e che queste ultime, come il frutto di fragola, sono dei falsi frutti, si può ipotizzare che anche nelle Gimnosperme i geni di tipo *AGAMOUS* abbiano un ruolo simile a quello definito per *FaSHP*.

TM8 è invece il primo gene ad essere stato isolato nell'ambito di un gruppo di geni MADS-box ad oggi poco studiati. Andando ad analizzare la sua espressione si è osservato come i trascritti siano presenti in modo pressoché ubiquitario nella pianta, in maniera del tutto simile a quanto già definito per i geni *TM8-like* delle Gimnosperme. In pomodoro, tuttavia, i trascritti raggiungono un massimo nel fiore. Per far luce sul ruolo di *TM8* sono state prodotte piante transgeniche che sovra-esprimono il gene e piante che invece lo sovra-esprimono nella forma di repressore trascrizionale. La presenza di stami dialitici nelle piante sovra-esprimenti *TM8* ha indotto a supporre un possibile ruolo del gene nel terzo verticillo florale, ipotesi supportata anche dall'analisi di espressione di altri geni MADS-box di identità florale. Oltre alla possibile funzione durante lo sviluppo del fiore, l'analisi fenotipica e molecolare delle piante sovra-esprimenti il gene nella forma di repressore trascrizionale ha portato ad ipotizzare un possibile coinvolgimento di *TM8* anche nello sviluppo di altri organi della pianta, sia vegetativi (foglia) che riproduttivi (frutto). Questa funzione del gene in varie fasi del ciclo vitale della pianta supporta l'idea che i geni di tipo *TM8* siano geni antichi, originatisi precocemente durante l'evoluzione dei geni MADS-box. Inoltre, il coinvolgimento del gene *TM8* di pomodoro nello sviluppo del frutto suggerisce che anche nelle Gimnosperme, dove tali geni sono espressi in modo simile nelle strutture carnose deputate alla disseminazione, essi possano intervenire durante lo sviluppo dei "frutti".

1. Introduzione

1.1 Introduzione generale

1.1.1 Il ruolo dei frutti nella dispersione dei semi

Nel corso della storia evolutiva delle piante terrestri la comparsa del seme ha segnato una tappa indubbiamente importante, conferendo alle piante che producono tale struttura, le Spermatofite, un notevole vantaggio rispetto alle altre piante vascolari. Il seme è il risultato di un evento riproduttivo per gamia, e porta al suo interno un embrione che di fatto è una pianta completa anche se miniaturizzata, la quale si trova in uno stato di quiescenza. Quando il seme maturo viene rilasciato nell'ambiente esso è dotato di strutture di protezione e tessuti di riserva indispensabili per il nutrimento dopo la germinazione. Il successo di questa struttura deriva principalmente dalla sua capacità di sopravvivenza e di colonizzazione di nuovi ambienti che, nel corso del tempo, ha permesso alle Spermatofite di conquistare la gran parte delle terre emerse.

Le Spermatofite viventi comprendono le Gimnosperme e le Angiosperme, le prime (letteralmente piante a "seme nudo") producono ovuli che generalmente maturano in semi all'aria e nei casi in cui vi siano dei rivestimenti, come citerò in seguito, l'ovulo è sempre nudo all'origine.

Gli ovuli delle Angiosperme (letteralmente piante a "seme protetto") sono invece racchiusi all'interno di foglie modificate, i carpelli, che vanno a costituire l'ovario florale. Nelle Angiosperme dunque l'ovulo è contenuto all'interno del fiore che è sostanzialmente un germoglio a crescita determinata, con internodi raccorciati e nodi che portano verticilli di foglie specializzate: gli antofilli sterili (sepalì e petalì, 1° e 2° verticillo) e gli sporofilli fertili (stamì e carpelli, 3° e 4° verticillo) (figura 1.1 A) (Raven *et al.*, 2002). Nel fiore si trovano pertanto riunite tutte le strutture necessarie alla riproduzione, anche le parti sterili hanno un ruolo in tal senso favorendo il trasporto, ad opera degli animali, del polline dagli stamì ai carpelli.

Ritornando all'ovulo delle Angiosperme, la sua fecondazione ed il suo successivo sviluppo in seme avvengono all'interno dell'ovario, il quale subisce in concomitanza delle importanti modificazioni. Il rilascio da parte del tubetto pollinico di segnali ormonali, che accompagnano i nuclei spermatici, determina infatti un rapido e transiente aumento della concentrazione di auxina a livello delle pareti dell'ovario. Quest'ultimo dà inizio ad una serie di moltiplicazioni cellulari che determinano in un'ultima analisi, la trasformazione dell'ovario in frutto.

Portando al suo interno i semi in via di formazione, il frutto li protegge, tuttavia questa non è la sua unica funzione: esso infatti ha anche l'importante compito di facilitare la

dispersione dei semi maturi nell'ambiente circostante. A maturità i frutti si possono aprire per far cadere i semi a terra oppure possono staccarsi tutti interi dalla pianta portando con sé anche i semi. La conseguenza è che i semi possono muoversi nell'ambiente e germinare in luoghi anche lontani dalla pianta che li ha prodotti.

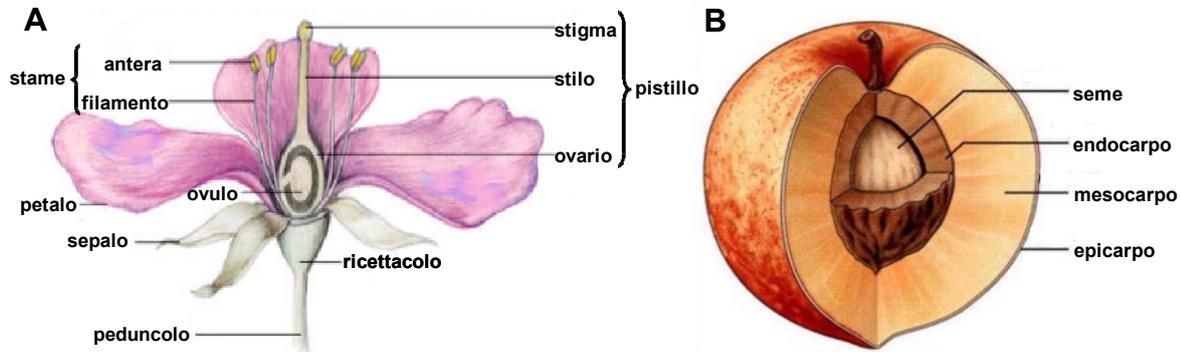


Figura 1.1 : Rappresentazione schematica delle strutture che costituiscono il fiore (A) ed il frutto (B). Modificato da http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio111/seeds_fruits_flowers.htm.

Al fine di ottimizzare il processo di disseminazione, nel corso dell'evoluzione è comparso un gran numero di tipi di frutti anche se, in generale, essi possono essere ricondotti a due categorie principali: i frutti secchi e quelli carnosì. Nel caso dei primi si tratta di forme ottimizzate per la dispersione ad opera del vento, dell'acqua, della gravità o mediante adesione al pelo degli animali. I frutti carnosì invece, ricchi di sostanze nutritive e resi attraenti da vistosi colori ed intense profumazioni, risultano appetibili per gli animali frugivori che, cibandosene, rilasciano i semi nell'ambiente con le proprie deiezioni. Come suggerisce anche il nome, la principale differenza tra frutti secchi e frutti carnosì è dovuta al contenuto d'acqua presente nel pericarpo. I frutti carnosì sono caratterizzati da un parenchima ricco di acqua e si distinguono essenzialmente in bacche, dotate di un endocarpo carnoso come nel caso del pomodoro e drupe che presentano invece un endocarpo lignificato come nel caso dell'albicocca. Dal momento che come sopra-indicato il frutto si sviluppa da una foglia modificata, in esso si possono identificare tre differenti strati che corrispondono all'epidermide superiore (epicarpo), al mesofillo (mesocarpo) ed all'epidermide inferiore (endocarpo) (figura 1.1 B). Nell'eventualità in cui altre parti fiorali intervengano nella formazione del frutto si parla di frutti accessori o più semplicemente di falsi frutti. Per esempio nei frutti del melo, del pero ed anche in quelli di fragola (paragrafo 1.2.1) la parte carnosa si origina dal ricettacolo florale che si accresce e si rende succulento. Anche le Gimnosperme producono semi ed hanno pertanto la necessità di disperderli nell'ambiente. Tuttavia le Gimnosperme non producono fiori e di conseguenza non sono in grado di produrre veri frutti. Nonostante ciò, in tutti i *phyla* di Gimnosperme esistenti

(*Coniferophyta*, *Ginkgophyta*, *Cycadophyta* e *Gnetophyta*) sono note specie che presentano delle strutture carnose associate ai semi (figura 1.2). Queste strutture possono avere origine diversa così, ad esempio, nel caso di *Taxus baccata* (*Coniferophyta*) il seme maturo è in gran parte avvolto dall'arillo, un rivestimento carnoso di colore rosso la cui formazione avviene *ex novo* durante la trasformazione dell'ovulo in seme (Lovisetto, 2007). Invece in *Ginkgo biloba*, l'unica specie esistente appartenente al phylum *Ginkgophyta*, i semi sono rivestiti da un sarcotesta carnoso, che si sviluppa dal tegumento ovulare esterno e racchiude al suo interno lo sclerotesta, un tegumento legnoso contenente l'embrione (figura 1.2). Sebbene queste strutture non possano essere considerate frutti botanici in senso stretto, esse possono essere accomunate ai falsi frutti delle Angiosperme e considerate frutti da un punto di vista funzionale dal momento che, attraendo gli animali frugivori, contribuiscono alla dispersione dei semi nell'ambiente.



Figura 1.2: Esempi di strutture carnose associate ai semi di alcune specie rappresentative dei quattro *phyla* di Gimnosperme oggi esistenti. Modificato da:

http://samlib.ru/img/g/gelxman_a_i/lhb/index.shtml;

http://news.xinhuanet.com/english/200709/30/xinsrc_03209043010135621877128.jpg;

<http://forestry.about.com/od/forestphotogalleries/ig/Ginkgo-Biloba-/Ginkgo-Fruit.htm>;

<http://www.wellgrowhorti.com/Page/LandscapePlants/Trees/Tree%20List%20G.htm>.

1.1.2 La sindrome di maturazione dei frutti carnosì

Le caratteristiche che rendono i frutti carnosì appetibili agli animali frugivori sono il risultato di una serie di ben noti cambiamenti biochimici, fisiologici e strutturali, il cui studio impegna oramai da decenni studiosi e ricercatori di tutto il mondo. Tali processi si verificano nelle fasi terminali dello sviluppo del frutto e sono noti nel complesso come

"sindrome di maturazione". Sebbene i programmi di sviluppo che controllano la maturazione si diversifichino nelle diverse specie, essi sono sempre accumulati da:

- variazioni del colore tramite la modificazione nel contenuto in pigmenti (clorofilla, carotenoidi e/o flavonoidi);
- perdita di consistenza dei tessuti (rammollimento);
- modificazione nel contenuto di zuccheri, acidi organici e composti volatili che influenzano le proprietà nutrizionali, nonché il profumo e l'aroma;
- aumentata suscettibilità ai patogeni come conseguenza del processo di rammollimento (Giovannoni, 2004).

Da un punto di vista macroscopico l'inizio della maturazione è indicato dalla variazione del colore dei frutti. I frutti immaturi sono generalmente verdi e si confondono con il fogliame, l'acquisizione di colori più o meno intensi fa sì che essi risaltino sullo sfondo delle foglie e che diventino così visibili agli animali i quali, riconoscendoli come maturi, se ne possono cibare.

La variazione di colore può avvenire in due distinti modi: nel primo caso i cloroplasti si trasformano in cromoplasti, durante tale trasformazione i tilacoidi che contengono i pigmenti fotosintetici si disassemblano e la clorofilla viene degradata, contemporaneamente vengono accumulati carotenoidi (Klee *and* Giovannoni, 2011) che sono composti di tipo terpenico. Ciò è quanto si verifica ad esempio nei pomodori, la cui colorazione rossa è dovuta all'accumulo di licopene. Nel secondo caso vengono prodotti ed accumulati nel vacuolo delle cellule del frutto composti di tipo fenolico (flavonoidi e/o antociani) che possono conferire colori che variano dal giallo al blu intenso (Taiz *and* Zaiger, 2006). La colorazione rossa della fragola e quella blu del mirtillo sono esempi dell'accumulo di questi pigmenti.

L'aspetto più studiato della sindrome di maturazione è senza dubbio il rammollimento, la ragione di ciò è principalmente di tipo economico, infatti più un frutto è tenero e minore è la sua conservabilità in seguito alla raccolta. Il rammollimento dei frutti carnosì è dovuto all'intenso metabolismo delle pareti cellulari. Durante la maturazione, infatti, le pareti cellulari vanno incontro ad una parziale degradazione che fa sì che vi sia un allentamento dei rapporti cellula-cellula. Le pareti cellulari dei frutti carnosì sono tipicamente pareti primarie di tipo pecto-cellulosico, composte in percentuali variabili da cellulosa, emicellulose, pectine, proteine ed altre molecole presenti in basse concentrazioni (Taiz *and* Zaiger, 2006). Tra queste componenti quelle maggiormente coinvolte nel rammollimento sono le pectine e le emicellulose. La degradazione delle pectine è particolarmente importante perché, oltre ad essere abbondantemente presenti nella parete primaria, esse sono i principali costituenti della lamella mediana, la struttura che fa da collante tra cellule adiacenti. La degradazione delle pectine ha pertanto un impatto importante sui contatti tra

cellule e di conseguenza sulla consistenza dei frutti. Il rammollimento è un processo geneticamente determinato che vede il coinvolgimento di una serie di enzimi, ciascuno in grado di agire su substrati specifici (Brummel *and* Harpster, 2001). Con lo scopo di controllare il processo di rammollimento sono stati effettuati molti esperimenti di silenziamento di geni codificanti enzimi degradativi. L'attenzione è stata rivolta sia a geni codificanti enzimi coinvolti nella degradazione delle pectine (β -galattosidasi, pectin metil esterasi (PME), poligalatturonasi) sia a geni codificanti enzimi coinvolti nella degradazione delle emicellulose (endo- β -1,4-glucanasi, xiloglucano endotransglucosilasi (XET)). I risultati di questi lavori, condotti principalmente in pomodoro, hanno messo in evidenza come non sia tanto l'attività di singoli enzimi, quanto piuttosto l'azione sinergica e temporalmente sincronizzata di un gran numero di essi ad avere un effetto sul rammollimento (Brummel *and* Harpster, 2001, Payasi *et al.*, 2009).

Oltre alle componenti strutturali della parete cellulare, un altro importante contributo alla consistenza dei tessuti del frutto è dato dal turgore cellulare. I fattori che influenzano il turgore dei frutti sono ancora poco chiari, tuttavia studi recenti condotti in pomodoro hanno messo in evidenza come la perdita d'acqua attraverso la cuticola e la successiva perdita di consistenza dei tessuti possa essere un meccanismo che, insieme al metabolismo delle pareti cellulari, contribuisce al rammollimento del frutto (Saladié *et al.*, 2007; Seymour *et al.*, 2012).

La produzione di aromi infine è un processo piuttosto complesso che vede il coinvolgimento di un gran numero di diverse vie metaboliche, esso è quello che indubbiamente più si differenzia tra frutti diversi nel contesto della sindrome di maturazione. I composti chimici responsabili dell'aroma sono molteplici, tra questi si annoverano sia sostanze solubili, principalmente zuccheri ed acidi, sia volatili, tra cui molti alcoli, aldeidi ed esteri. Alla formazione degli aromi contribuiscono sia il processo di rammollimento, sia le vie biosintetiche che portano alla produzione dei pigmenti responsabili del colore, fornendo substrati che possono esaltare le qualità aromatiche di un frutto. A causa della sua complessità, la formazione degli aromi è un processo ancora poco noto anche se attualmente è molto studiato, data la sua importanza come componente chiave delle proprietà organolettiche di un frutto carnoso.

A differenza dei frutti carnosi delle Angiosperme, pressoché nulla è noto relativamente alla maturazione delle strutture carnose che avvolgono il seme delle Gimnosperme. Solo di recente il mio gruppo di ricerca ha cercato di affrontare questa problematica mediante il clonaggio e la successiva analisi d'espressione di geni potenzialmente implicati nella sindrome di maturazione dei frutti di *T.baccata* e *G.biloba*. I risultati di questo approccio hanno mostrato come nella maturazione dell'arillo di tasso siano coinvolti lo stesso tipo di geni che intervengono nel rammollimento e nella produzione di colore dei veri frutti delle Angiosperme, inoltre relativamente al colore è stato dimostrato che durante questo

processo vi è un accumulo di carotenoidi che vengono sintetizzati *ex novo*. La situazione sembra essere differente in *G. biloba*, in questo caso non sono stati identificati geni che intervengono nella maturazione in modo simile a quanto si verifica nei veri frutti. La polpa di *G. biloba* sembra andare incontro ad un processo di senescenza piuttosto che di maturazione, la colorazione giallastra del "frutto" maturo sembra infatti essere dovuta ai carotenoidi implicati nella fotosintesi che divengono visibili in seguito alla degradazione della clorofilla, in modo analogo a quanto si verifica nelle foglie senescenti. Il più rudimentale processo di maturazione osservato in *G. biloba* è stato messo in relazione alla maggiore antichità del gruppo tassonomico *Ginkgophyta* rispetto al gruppo *Taxaceae* (Lovisetto *et al.*, 2012). Sembra dunque che i meccanismi che operano durante la maturazione dei frutti delle Angiosperme si fossero originati già nel corso dell'evoluzione delle più antiche Gimnosperme.

1.1.3 La regolazione ormonale della maturazione dei frutti carnosì

Nel controllo della maturazione dei frutti carnosì la regolazione da parte di fattori ormonali ha un ruolo prominente. Senza dubbio l'ormone più studiato a tal riguardo è l'etilene. E' proprio in base al suo coinvolgimento o meno che i frutti carnosì vengono classicamente suddivisi in due gruppi: i frutti climaterici e quelli non climaterici. Nei frutti climaterici l'inizio della maturazione è segnato da un incremento nella respirazione cellulare noto anche come climaterio respiratorio, al quale si accompagna un aumento nella produzione dell'ormone gassoso etilene (figura 1.3). La pesca, il pomodoro e la banana sono esempi di frutti climaterici. I frutti non climaterici non presentano, invece, alcun aumento né nella respirazione, né nella produzione di etilene; tra questi frutti si annoverano gli agrumi, l'uva e la fragola.

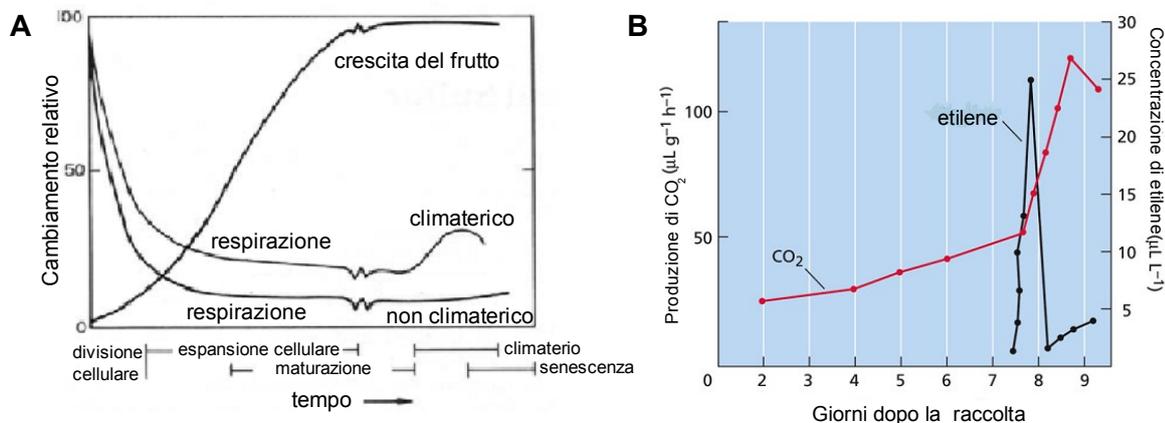


Figura 1.3: (A) Differente respirazione nei frutti climaterici e non climaterici in relazione allo sviluppo (modificato da Salisbury *and* Ross, 1978). (B) Climaterio respiratorio ed etilenico, tipici dei frutti climaterici (modificato da Taiz *and* Zeiger, 2006).

Attualmente si ritiene che il ruolo dell'etilene nella maturazione dei frutti climaterici sia quello di dare il via e coordinare il processo di maturazione (Alexander *and* Grierson, 2002). Ciò è sottolineato dal fatto che la somministrazione di etilene esogeno a frutti immaturi ma che hanno completato la crescita, determina un'anticipazione della maturazione. Questa pratica attiva la sintesi di ormone endogeno attraverso un sistema autocatalitico. Nel caso dei frutti non climaterici ciò non si verifica ed il trattamento con etilene non modifica il decorso generale della maturazione.

Studi approfonditi hanno messo in evidenza come la sintesi di etilene possa avvenire secondo due sistemi: il sistema 1 ed il sistema 2. Il primo sistema funziona durante la normale crescita vegetativa ed è responsabile della produzione di etilene a livelli basali in tutti i tessuti, compresi quelli dei frutti non climaterici. Il secondo sistema opera invece soprattutto durante la maturazione dei frutti climaterici ed in questo caso l'ormone stesso è in grado di stimolare la sua biosintesi che procede così in modo autocatalitico (Alexander *and* Grierson, 2002), come sottolineato in precedenza.

Nelle piante l'etilene viene prodotto dalla L-metionina che viene modificata in S-adenosil-L-metionina (SAM). Questo composto viene poi convertito in acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC) ad opera dell'enzima ACC sintasi (ACS) ed infine l'etilene si origina mediante ossidazione dell'ACC ad opera dell'enzima ACC ossidasi (ACO). Questi due enzimi sono codificati da piccole famiglie geniche e geni diversi vengono espressi a seconda che debba essere attivato il primo od il secondo sistema. Ancora agli albori dello studio della maturazione, il silenziamento con costrutti antisenso per i geni *ACS* ed *ACO*, espressi nel frutto di pomodoro, ha portato ad un importante rallentamento della maturazione che poteva essere fatta ripartire mediante trattamento con etilene esogeno (Hamilton *et al.*, 1990; Oeller *et al.*, 1991), mettendo così in evidenza il ruolo chiave di questi enzimi.

L'importanza dell'etilene per la maturazione dei frutti climaterici è stata ulteriormente evidenziata dallo studio della via di trasduzione del segnale ed in particolar modo dalla caratterizzazione dei recettori. A tal proposito val la pena menzionare il mutante di pomodoro *nr* (*never ripe*) che, mutato in uno dei recettori, è insensibile all'etilene ed incapace di far maturare i frutti prodotti (Lanahan *et al.*, 1994).

Nonostante l'etilene abbia un ruolo chiave nella maturazione dei frutti climaterici è ormai chiaro che anche altri ormoni tra cui l'auxina e l'acido abscissico (ABA) contribuiscono alla regolazione di questo processo, tuttavia la loro funzione non è ancora stata così ben caratterizzata come nel caso dell'etilene. Studi condotti in pesca hanno messo in evidenza come durante la maturazione vi sia un aumento di auxina nel mesocarpo (Miller *et al.*, 1987), che si accompagna ad una espressione differenziale di geni implicati nella trasduzione del segnale ormonale (Trainotti *et al.*, 2007; El-Sharkawy *et al.*, 2012).

Attualmente si ritiene che l'auxina possa avere sia un effetto diretto sulla maturazione che mediato da un *cross-talk* con l'etilene (Trainotti *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda invece l'acido abscissico, studi fisiologici condotti in pomodoro hanno evidenziato come il trattamento con l'ormone esogeno di frutti immaturi a crescita ultimata sia in grado di accelerare la maturazione. Ciò è supportato dall'espressione di geni implicati nella biosintesi di ABA e dall'accumulo dell'ormone stesso prima del climaterio etilenico (Zhang *et al.*, 2009). Il successivo silenziamento, mediante *RNA interference*, dell'espressione del gene codificante l'enzima NCED (9 cis epossicarotenoide diossigenasi), uno degli enzimi chiave nella biosintesi dell'ABA ha portato ad ipotizzare che l'ABA possa intervenire nella maturazione sia direttamente (Sun *et al.*, 2012b), sia controllando almeno in parte la produzione e l'azione dell'etilene (Sun *et al.*, 2012a).

A differenza dei frutti climaterici, molto meno è noto relativamente al controllo ormonale della maturazione nei frutti non climaterici. In particolare non è ancora chiaro se esista in questi frutti un meccanismo di regolazione comune analogo a quello svolto dall'etilene nei frutti climaterici e quali ormoni possano essere coinvolti.

Sebbene, come sottolineato in precedenza, la maturazione dei frutti non climaterici non sia associata a variazioni nella produzione di etilene, in alcuni di questi frutti vi sono degli aspetti della sindrome di maturazione dipendenti dall'etilene. In vite, ad esempio, è stato dimostrato che la percezione dell'etilene è critica per l'accumulo dei pigmenti (le antocianine), il contenuto di acidi, la produzione di aroma, nonché l'espansione della bacca (Chervin *et al.*, 2004, Chervin *et al.*, 2008). Negli agrumi è stata suggerita l'esistenza di un sistema di produzione di etilene autocatalitico simile a quello dei frutti climaterici, inoltre è noto che nei frutti di questa pianta l'etilene è in grado di indurre la degradazione della clorofilla dell'epicarpo (Katz *et al.*, 2004).

Vi sono poi diverse evidenze che indicano un possibile ruolo sia dell'auxina che dell'acido abscissico anche nella maturazione di alcuni frutti non climaterici. Per quanto riguarda l'auxina, essa agisce come inibitore della maturazione sia in fragola che in vite (Trainotti *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 1997). Nella vite ad esempio, il trattamento con auxina esogena ha un effetto negativo sulla maturazione, rallentando l'inizio del processo di rammollimento ed inibendo l'espressione di geni implicati nella biosintesi delle antocianine (Davies *et al.*, 1997).

Per quanto concerne invece l'acido abscissico, vi sono indicazioni che in modo simile a quanto descritto per il pomodoro, esso agisca come regolatore positivo della maturazione di alcuni frutti non climaterici. Nel caso della vite un aumento della concentrazione di ABA endogeno è associato all'inizio della maturazione (Devies *et al.*, 1997), inoltre è stato dimostrato che il trattamento con ABA esogeno promuove la pigmentazione, l'aumento delle dimensioni della bacca e l'accumulo di zuccheri (Wheeler *et al.*, 2009; Koyama *et al.*,

2010). Un simile ruolo per l'ABA è stato proposto anche relativamente alla maturazione del frutto di fragola (paragrafo 1.2.3).

1.1.4 La regolazione trascrizionale della maturazione dei frutti carnosì

Sebbene, come sottolineano le innumerevoli analisi funzionali ad oggi disponibili, il controllo ormonale della maturazione sia di fondamentale importanza, è oramai chiaro che esso non è il solo ad agire. Studi condotti in pomodoro, il quale costituisce senza dubbio il sistema di riferimento per lo studio della regolazione della maturazione dei frutti carnosì (Seymour *et al.*, 2012), hanno infatti sottolineato come l'etilene non sia sufficiente per attivare la maturazione (Giovannoni, 2004). L'osservazione che in pomodoro l'esposizione all'etilene non è in grado di indurre la maturazione in frutti giovani, insieme alla caratterizzazione di una serie di mutanti (*rin*, *ripening inhibitor*; *nor*, *non-ripening*; *cnr*, *colorless nonripening*), ha messo in evidenza come altri fattori, dipendenti dallo sviluppo, debbano essere coordinati con la produzione di etilene. I mutanti sopraccitati sono particolarmente interessanti in quanto fanno frutti che non producono etilene e non sono in grado di maturare, neppure se trattati con etilene esogeno, anche se in queste piante il sistema di percezione dell'etilene è intatto (Klee *and* Giovannoni 2011). E' necessario dunque che i frutti acquisiscano una "competenza alla maturazione", definita come la somma degli eventi che si devono verificare prima dell'intervento dell'etilene, affinché la maturazione possa procedere (Martel *et al.*, 2011). I geni mutati nei diversi mutanti codificano per diversi tipi di fattori di trascrizione, tuttavia essi non sono gli unici; ad oggi è oramai chiaro che a monte dell'etilene agisce un complesso *network* molecolare che vede coinvolti un gran numero di fattori trascrizionali (paragrafo 1.3.1). Questi studi condotti in pomodoro indicano come la regolazione trascrizionale su base combinatoria costituisca un sistema di controllo chiave per la maturazione. A dimostrazione del fatto che tale tipo di regolazione è comune nei frutti carnosì, fattori di trascrizione implicati in questo meccanismo di controllo sono stati identificati anche in altri frutti (Seymour *et al.*, 2012). In particolare fattori di trascrizione di tipo MADS-box sono stati caratterizzati oltre che in pomodoro anche in altri frutti climaterici, quali pesca e banana (Tadiello *et al.*, 2009; Elitzur *et al.*, 2010), ed in mirtillo e fragola che sono invece non climaterici (Jaakola *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2011). Queste scoperte suggeriscono la presenza di componenti comuni nei *network* molecolari che regolano la maturazione dei frutti climaterici e di quelli non climaterici.

1.1.5 I geni MADS-box

I geni MADS-box codificano per una famiglia di fattori di trascrizione inizialmente studiati per il ruolo chiave svolto durante lo sviluppo del fiore. Essi hanno infatti la funzione di selettori omeotici, dal momento che una loro mutazione determina la sostituzione di una parte con quella normalmente presente in un altro verticillo florale. Venti anni di ricerca hanno dimostrato come questo sia soltanto uno dei tanti ruoli svolti da questi fattori di trascrizione, essi intervengono infatti nella morfogenesi di quasi tutti gli organi della pianta nel corso del suo ciclo vitale (Smaczniack *et al.*, 2012a).

I fattori di trascrizione MADS-box non costituiscono tuttavia una prerogativa delle piante, dal momento che essi sono stati identificati sia negli animali che nei funghi; in questi due regni contribuiscono ad una ampia gamma di processi biologici che spazia dalla proliferazione e differenziazione cellulare negli animali, alla risposta ai ferormoni nei funghi (Messenguy *and* Dubois, 2003).

Il termine MADS, che identifica il dominio di legame al DNA di questi fattori trascrizionali, è un acronimo che trae origine dalle iniziali dei quattro geni che per primi sono stati identificati come appartenenti a questa famiglia: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1)* implicato nella determinazione del tipo sessuale in *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* e *DEFICIENS*, geni d'identità florale in *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus* e *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)*, fattore di risposta al siero in *Homo sapiens*. Secondo dati recenti il dominio MADS si sarebbe originato come risultato della duplicazione e successiva divergenza di una sequenza di DNA codificante la subunità A degli enzimi topoisomerasi IIA (Gramzow *et al.*, 2010). In seguito un'ulteriore duplicazione e diversificazione avrebbero originato nel più recente antenato degli eucarioti esistenti i due principali tipi di geni MADS-box ad oggi conosciuti: i geni di tipo I o *SRF-like* ed i geni di tipo II o *MEF2-like (MYOCYTE ENHANCER FACTOR 2)* (Gramzow *et al.*, 2010).

Successivamente i geni MADS-box si sono diversificati in modi differenti nelle diverse linee evolutive. Nel caso di protisti, animali e funghi, il numero di questi geni è rimasto ridotto mentre, nel caso delle piante, vi è stata un'espansione dovuta ad eventi di duplicazione, per cui nei genomi delle Angiosperme vi sono più di 100 rappresentanti di questa famiglia genica (Gramzow *and* Theissen, 2010). Nei genomi delle piante superiori si annoverano sia geni MADS-box di tipo I che di tipo II. Sebbene il numero dei geni di tipo I superi quello dei geni di tipo II, solo di recente la comunità scientifica vi ha rivolto la propria attenzione, ed attualmente si ritiene che essi intervengano nella formazione del gametofito femminile, dell'embrione e nello sviluppo dell'endosperma (Masiero *et al.*, 2011). I geni di tipo II delle piante, noti come geni di tipo MIKC, sono stati studiati in modo decisamente più approfondito ed è a questi che mi riferirò in questo lavoro.

I fattori di trascrizione MIKC sono caratterizzati da una struttura modulare in cui il dominio MADS è affiancato da altri tre domini proteici (figura 1.4 A). Per capire la funzionalità di tali domini è importante sottolineare che questi fattori trascrizionali si legano al DNA sotto forma di dimeri e tetrameri (sia omo- che etero-) (figura 1.4 B, C) (Theissen, 2000). I quattro domini presenti dall'estremità N-terminale a quella C-terminale delle proteine MIKC sono i seguenti:

Dominio M: il dominio MADS è la porzione più conservata della proteina, trattasi di una regione di circa 60 amminoacidi il cui compito principale è permettere il legame al DNA, oltre ad intervenire nella dimerizzazione e nell'interazione con altri fattori trascrizionali. La struttura proteica secondaria del dominio MADS consiste in un α -elica, implicata nel legame al DNA lungo il solco minore (Pellegrini *et al.*, 1995) e due foglietti β antiparalleli coinvolti nella dimerizzazione (Kaufmann *et al.*, 2005). Il dominio MADS media il legame a sequenze che mostrano similarità con la sequenza consenso CC(A/T)₆GG, denominata CARG-box, presente nelle regioni promotoriali dei geni regolati da questi fattori di trascrizione (Shore *et al.*, 1995).

Dominio I: il dominio *intervening* è una regione di lunghezza variabile, costituita in media da 30 amminoacidi ma che si può estendere fino a 66/85 amminoacidi. Secondo i dati disponibili questa regione forma un α -elica implicata nella dimerizzazione (Kaufmann *et al.*, 2005). Sembra anche che il dominio I influenzi la specificità di formazione dei dimeri che legano il DNA.

Dominio K: il dominio *keratin-like* è una regione di circa 70 amminoacidi che risulta essere conservato, anche se in maniera minore al dominio MADS. Esso è caratterizzato dalla presenza di residui idrofobici spazati in modo tale da acconsentire la formazione di eliche anfipatiche necessarie per l'interazione con il dominio K di un'altra proteina MADS-box, mediando così la formazione di dimeri (Shore *et al.*, 1995). Il dominio K si ripiega in tre α -eliche anfipatiche: le prime due (K1 e K2) sono importanti per determinare la formazione dei dimeri, mentre la terza elica (K3), assieme al dominio C-terminale sembra abbia un ruolo nella formazione di complessi tetramerici (figura 1.4 B, C) (Immink *et al.*, 2010).

Dominio C: il dominio C-terminale è la regione più variabile di queste proteine sia in termini di sequenza che di lunghezza. Attualmente si ritiene che tale dominio sia coinvolto nella formazione di complessi multimerici e nell'attivazione della trascrizione (Egea-Cortines *et al.*, 1999; de Folter and Angenent, 2006).

In alcune proteine MIKC è inoltre presente un'estensione all'estremità N-terminale del dominio MADS, si parla in questi casi di proteine NMIKC (Theissen *et al.*, 2000).

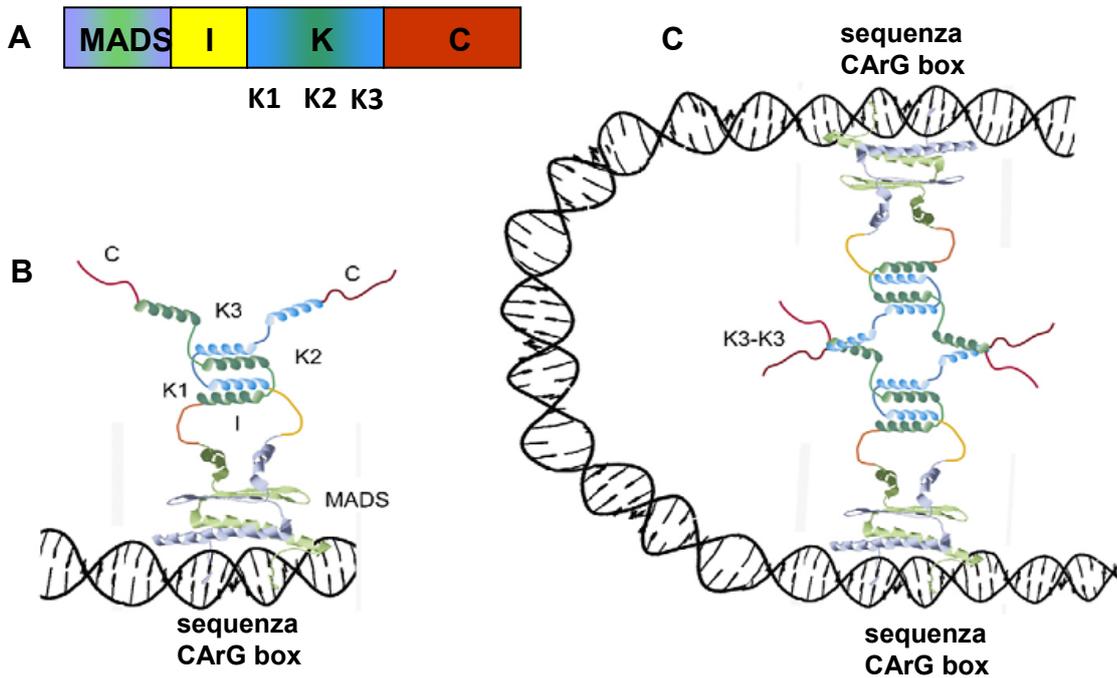


Figura 1.4: (A) Struttura modulare di una proteina MADS-box di tipo MIKC. (B) Rappresentazione schematica di un dimero di fattori di trascrizione MADS-box legati al DNA. (C) Interazione con il DNA di un ipotetico tetramero di proteine MADS-box (modificato da Immink *et al.*, 2010).

Studi filogenetici condotti relativamente ai geni MIKC di *A. thaliana* hanno permesso di classificarli in 13 sottofamiglie denominate: *AG*, *AGL2*, *AGL6*, *AGL12*, *AGL15*, *AGL17*, *DEF*, *FLC*, *GGM13*, *GLO*, *SQUA*, *STMADS11* e *TM3-like* (Becker and Theissen, 2003; Diaz Riquelme *et al.*, 2009). Ulteriori studi condotti in altre specie di Angiosperme hanno portato all'identificazione di una nuova sottofamiglia, quella dei geni *TM8-like*, che non presenta rappresentanti in *A. thaliana* (Becker and Theissen, 2003). Tra questi geni si annoverano quelli di identità fiorale, menzionati all'inizio del paragrafo, il cui studio ha preso il via grazie ad una serie di mutanti omeotici fiorali di *A. thaliana* e di *A. majus*. Nel 1991, al fine di spiegare in che modo questi geni fossero implicati nel determinare la formazione del fiore, è stato proposto un modello, noto come "il modello ABC" (Coen and Meyerowitz, 1991). Secondo questo modello, che si basa prevalentemente sullo studio dei mutanti di *A. thaliana*, l'identità d'organo nei diversi verticilli fiorali è determinata da una specifica combinazione di tre classi di geni, codificanti principalmente fattori di trascrizione MADS-box. I geni di classe A, rappresentati da *APETALA1* (*AP1*) (sottofamiglia *SQUA*) ed *APETALA2* (*AP2*) (quest'ultimo non è un gene MADS-box), controllano l'identità d'organo nel primo e nel secondo verticillo, i geni di classe B, rappresentati da *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*) (sottofamiglie *DEF* e *GLO*),

controllano la determinazione degli organi nel secondo e terzo verticillo ed infine i geni di classe C, rappresentati da *AGAMOUS* (*AG*) (sottofamiglia *AG*), controllano lo sviluppo del terzo e quarto verticillo. Pertanto la classe A specifica la formazione dei sepali, la combinazione delle classi A e B interviene nella formazione dei petali, lo sviluppo degli stami è regolato dalle classi B e C ed infine la sola classe C interviene nella formazione dei carpelli. Il modello prevede inoltre che le classi A e C si regolino reciprocamente in maniera negativa, così che i geni di classe A vengono espressi in tutto il fiore quando i geni di classe C sono mutati e viceversa (Theissen, 2001).

Con l'impiego di approcci di *forward* e *reverse genetics* ben presto è emerso che i geni di classe A, B e C sono necessari ma non sufficienti a specificare l'identità degli organi fiorali. La successiva scoperta che la mutazione di tre dei quattro geni *SEPALLATA* (sottofamiglia *AGL2*) di *A. thaliana*, normalmente espressi in tutti i verticilli fiorali, determina la conversione di tutti gli organi fiorali in sepali (Pelaz *et al.*, 2000), ha portato ad inserire questi geni in una nuova classe di selettori omeotici: i geni di classe E. La conferma dell'importanza dei geni di classe E per lo sviluppo di tutti i verticilli fiorali è stata ottenuta con il quadruplo mutante dei geni *SEPALLATA* nel quale tutti gli organi fiorali vengono convertiti in foglie vegetative (Ditta *et al.*, 2004). È stata inoltre individuata una quinta classe di geni, la classe D, implicata nello specificare l'identità degli ovuli. In seguito a queste scoperte il "modello ABC" è stato rinominato come "modello ABC(D)E" ed esteso al così detto "modello del quartetto florale" (Theissen *and* Saedler, 2001) (figura 1.5), il quale spiega, in termini di interazioni molecolari, il meccanismo d'azione delle proteine MADS-box. Tale modello propone che l'identità di ciascun organo florale sia controllata da almeno un complesso di quattro fattori di trascrizione MADS-box (quartetto). Questi tetrameri si legano alle sequenze CArG-box presenti nelle regioni promotoriali dei geni *target* e ne regolano di conseguenza l'espressione. Il modello suggerisce anche che due dimeri di ogni quartetto riconoscano due differenti sequenze CArG-box che vengono portate in prossimità attraverso il ripiegamento del DNA che le separa (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Theissen *and* Saedler, 2001) (figura 1.4 C). Recentemente, grazie all'impiego di tecniche di spettrometria di massa particolarmente sensibili, è stato possibile isolare complessi di proteine MADS-box da tessuti vegetali. In questi complessi, oltre agli attesi fattori di trascrizione MADS-box, sono stati identificati co-repressori, fattori di rimodellamento della cromatina ed altri fattori di trascrizione, possibilmente implicati nel selezionare i geni *target* (Smaczniack *et al.*, 2012b).

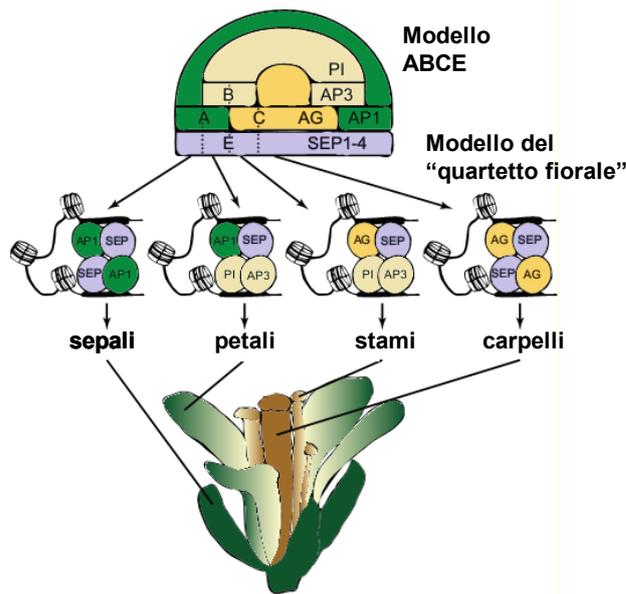


Figura 1.5: Rappresentazione del modello ABCE e del modello del "quartetto fiorale" applicati allo sviluppo del fiore di *Arabidopsis thaliana* (modificato da Smaczniack *et al.*, 2012a).

Dopo circa vent'anni dalla prima formulazione del classico "modello ABC", vi sono alcune evidenze che indicano che esso possa, almeno per alcuni aspetti, non avere una validità generale. Se gli studi funzionali dei geni di classe B e C condotti in un'ampia gamma di specie hanno dimostrato infatti che le loro funzioni sono ben conservate a livello molecolare, altrettanto non può essere affermato per i geni di classe A (Causier *et al.*, 2010). Dal momento che i dati provenienti da specie diverse sembrano indicare situazioni di vario tipo, è stato suggerito che sarebbe più opportuno far riferimento ad un più semplice "modello BC" (Heijmans *et al.*, 2012) o eventualmente ridefinire la classe A, in termini di funzione in grado di acconsentire alle classi B e C di esercitare il proprio controllo sull'identità degli organi fiorali (Causier *et al.*, 2010). Nonostante queste precisazioni, il "modello ABC" continua a costituire un punto di riferimento per lo studio dei geni di identità degli organi fiorali.

Sebbene i geni appena descritti abbiano un ruolo nella formazione del fiore che è una struttura tipica delle Angiosperme, l'origine di almeno alcuni di essi ha preceduto la comparsa delle piante a fiore. In alcune specie di Gimnosperme sono stati infatti identificati putativi ortologi dei geni di classe B e di classe C, il cui profilo di espressione è simile ai geni delle Angiosperme (Theissen and Melzer, 2007). Nelle Gimnosperme i geni di classe C vengono espressi nelle strutture riproduttive sia maschili che femminili, mentre l'espressione dei geni di classe B è ristretta agli organi riproduttivi maschili. Inoltre esperimenti di espressione ectopica e complementazione hanno dimostrato come questi geni abbiano la stessa funzione degli ortologi presenti nelle piante a fiore (Tandre *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). Queste evidenze indicano che un semplice "modello BC", secondo il quale gli organi riproduttivi femminili e maschili vengono specificati rispettivamente dai soli geni di classe C e dall'insieme dei geni di classe C e B, era già presente nel più recente antenato delle piante a seme esistito circa 300 milioni di anni fa

(Melzer *et al.*, 2010). Secondo i dati presenti in letteratura, anche le proteine MADS-box delle Gimnosperme, in maniera del tutto simile a quelle delle Angiosperme, sono in grado di formare complessi multimerici (Wang *et al.*, 2010), ciò indica che il meccanismo molecolare che regola il meccanismo d'azione di questi fattori trascrizionali si è conservato nel corso dell'evoluzione delle piante a seme.

1.1.6 I geni MADS-box e lo sviluppo dei frutti

Se si considera che il frutto deriva da una modificazione del fiore, non è affatto sorprendente pensare che geni MADS-box, implicati nella formazione del fiore, possano essere successivamente reclutati per la sua trasformazione in frutto. I primi geni MADS-box per i quali è stata definita una funzione in tal senso appartengono all'organismo modello *A. thaliana*. *Arabidopsis* produce un frutto secco, la siliqua, costituito da due valve che si originano dai due carpelli le quali si uniscono al replo, una fine struttura centrale. Al margine tra le valve ed il replo un esiguo numero di cellule costituisce la zona di deiscenza. A maturità la degradazione della lamella mediana di questa struttura fa sì che si verifichi il distacco delle valve dal replo (deiscenza), permettendo così la dispersione dei semi. Tra i geni implicati nella formazione della zona di deiscenza i primi ad essere stati identificati sono due geni MADS-box di classe C: *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) e *SHATTERPROOF2* (*SHP2*), la cui contemporanea mutazione determina difetti nella deiscenza del frutto, dovuti ad un differenziamento non corretto delle cellule del margine valva-replo (Liljegren *et al.*, 2000). L'espressione di questi due geni è soggetta a regolazione da parte di altri fattori di trascrizione tra cui *FRUITFULL* (*FUL*), un gene MADS-box (sottofamiglia *SQUA*) che impedisce l'espressione dei geni *SHP* nelle valve (Ferrandiz *et al.*, 2000).

Come già citato è oramai noto che alcuni geni MADS-box intervengono anche nello sviluppo e nella maturazione dei frutti carnosì. In particolare anche per questi frutti è stato dimostrato il coinvolgimento di geni MADS-box di classe C, quali il gene *TAGL1* di pomodoro ed il gene *PpPLENA* di pesco e di geni ortologi di *FUL* quali il gene *VmTDR4* di mirtillo ed i geni *FUL 1* (*TDR4*) e *FUL2* di pomodoro. Per quanto concerne *TAGL1* è stato messo in evidenza come esso abbia un ruolo specifico nel regolare alcuni aspetti della maturazione, in particolare esso interviene nell'accumulo di carotenoidi, nella degradazione della clorofilla, nell'espansione della polpa e nella produzione di etilene (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010). Un ruolo simile è stato proposto anche per *PpPLENA* il quale, quando sovra-espresso in pomodoro, determina la conversione dei sepali, normalmente fogliacei in strutture carnose che maturano in modo simile ai frutti (Tadiello *et al.*, 2009). Infine, relativamente ai geni *VmTDR4* e *FUL1/2* è stato dimostrato che il primo ha un ruolo importante nell'accumulo di antociani durante la maturazione del

mirtillo (Jaakola *et al.*, 2010), mentre gli altri due intervengono nella produzione di componenti della cuticola, di composti volatili, nonché in modifiche delle pareti cellulari durante la maturazione dei frutti di pomodoro (Bemer *et al.*, 2012). Vi è inoltre un altro clade di geni MADS-box che annovera alcuni esponenti per i quali è stato proposto un ruolo di regolazione della maturazione: trattasi dei geni di tipo *SEPALLATA*. Tra questi, oltre al gene *RIN* di pomodoro attualmente considerato il regolatore generale della maturazione del frutto di pomodoro (paragrafo 1.3.2), vi è il gene *FaMADS9* di fragola, il cui silenziamento inibisce la corretta formazione degli acheni e del ricettacolo carnoso (paragrafo 1.2.4).

Tutti questi esempi dimostrano come i geni MADS-box abbiano un ruolo importante e universale nello sviluppo dei frutti, essi sono infatti coinvolti nei *network* molecolari che regolano la maturazione sia dei frutti secchi, sia di quelli carnosì.

L'importanza dei geni MADS-box per lo sviluppo del frutto, insieme al fatto che questa famiglia di fattori trascrizionali è presente anche nelle Gimnosperme, ha portato il mio gruppo di ricerca ad interrogarsi in merito al possibile coinvolgimento degli stessi nello sviluppo delle strutture carnose associate ai semi caratteristiche delle Gimnosperme. Utilizzando l'approccio di clonaggio e successiva analisi di espressione, impiegato anche per i geni della sindrome di maturazione, è stato dimostrato che geni MADS-box di classe C, di tipo *AGL6* e *TM8-like* sono espressi nel corso dello sviluppo dei "frutti" di *G.biloba* e di *T.baccata* (Lovisetto *et al.*, 2012). I geni di classe C, come già sottolineato, sono ortologi di quelli delle Angiosperme, i geni *AGL6-like* sono filogeneticamente correlati ai geni *SEPALLATA*, assenti invece nelle Gimnosperme, infine i geni di tipo *TM8* costituiscono un gruppo di geni MADS-box, originariamente identificato in pomodoro, per il quale nulla è noto relativamente alla funzione (Heijmans *et al.*, 2012). La scoperta dell'espressione dei geni MADS-box durante lo sviluppo di queste strutture carnose indica che i meccanismi molecolari di base sottendenti alla formazione dei frutti carnosì, possano essere conservati nelle Gimnosperme e nelle Angiosperme, suggerendo che tali *network* molecolari si siano sviluppati indipendentemente dalla presenza del fiore. Poiché la caratterizzazione funzionale dei geni di Gimnosperme risulta assai difficile in quanto tali piante sono recalcitranti sia alla trasformazione che alla rigenerazione, in questo lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata su geni MADS-box di Angiosperme, i cui omologi sono espressi nei frutti delle Gimnosperme; in particolare sono stati presi in considerazione un gene di classe C di fragola ed il gene *TM8* di pomodoro. La fragola si propone come un ottimo modello per questo tipo di studio, dal momento che essa produce un falso frutto simile alle strutture carnose associate ai semi delle Gimnosperme. Per quanto riguarda il gene *TM8*, si è deciso di studiarlo in pomodoro, in quanto al momento dell'inizio del presente lavoro nulla era noto in merito alla sua possibile presenza in fragola. Il pomodoro costituisce inoltre un ottimo sistema di riferimento per lo studio dei frutti carnosì.

1.2 Fragaria x ananassa

La fragola appartiene alla famiglia *Rosaceae*, genere *Fragaria*. La specie selvatica più nota di questo genere è *Fragaria vesca*, trattasi di una specie diploide ($2n=14$) considerata la specie progenitrice delle varietà ottoploidi oggi coltivate ($8n=56$). Tra queste ultime la più comune è *Fragaria x ananassa* che deriva dall'incrocio di due specie ottoploidi: *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, originarie rispettivamente del Cile e del sud degli Stati Uniti.

La fragola è attualmente uno dei sistemi di riferimento per lo studio della maturazione nei frutti non climaterici (Giovannoni, 2004).

1.2.1 Il frutto di fragola

Nel linguaggio comune il termine frutto di fragola indica l'insieme della polpa edule e degli acheni distribuiti sulla sua superficie. Da un punto di vista botanico gli acheni rappresentano il vero frutto di fragola, mentre il ricettacolo carnoso costituisce un falso frutto. Gli acheni si originano dai numerosi ovari presenti sul ricettacolo florale, a maturità essi sono composti da un pericarpo duro e relativamente spesso, da un sottile rivestimento del seme (testa), da un endosperma costituito da un singolo strato cellulare e da un singolo embrione (Perkins-Veazie, 1995). Il ricettacolo carnoso prende invece origine dal ricettacolo florale e risulta essere costituito da un cilindro centrale, da un cortex contenente cellule parenchimatiche e da uno strato epidermico esterno. Sulla superficie di quest'ultimo sono inseriti gli acheni, i quali sono connessi agli strati più interni attraverso una serie di fasci vascolari (Perkins-Veazie, 1995).

Lo sviluppo degli acheni precede la fase finale di espansione del ricettacolo, infatti al termine della maturazione degli acheni si assiste ad un aumento nel tasso di crescita del ricettacolo ed alla sua successiva maturazione (Perkins-Veazie, 1995).

In questo lavoro lo sviluppo del frutto è stato suddiviso in 7 stadi: verde piccolo, verde grande 1, verde grande 2, bianco1, bianco 2, rosa e rosso (paragrafo 3.1.2). La maturazione ha inizio a partire dallo stadio bianco1 e risulta essere completa (stadio rosso) circa 30 giorni dopo l'antesi.

1.2.2 La sindrome di maturazione del frutto di fragola

Come per gli altri frutti carnosi, anche nel corso della maturazione del ricettacolo carnoso del frutto di fragola si verifica una serie di complessi cambiamenti biochimici, che determinano profonde modifiche nella consistenza della polpa, nella pigmentazione nonché nella produzione di aromi. Tali cambiamenti sono accompagnati sia da importanti

variazioni a livello trascrizionale (Aharoni *and* O'Connell, 2002), sia nel contenuto in metaboliti (Fait *et al.*, 2008).

Una delle caratteristiche più evidenti della maturazione del frutto di fragola è sicuramente il rapido rammollimento che ne determina un'assai breve vita post-raccolta. La riduzione nella consistenza della polpa ha inizio già tra gli stadi di sviluppo verde e bianco e procede poi velocemente nel corso della maturazione vera e propria (Perkins-Veazie, 1995). Attualmente si ritiene che il rammollimento sia da imputare ad una marcata dissoluzione della lamella mediana delle cellule del parenchima corticale. Nei frutti rossi vi sono infatti ridotte aree di contatto tra cellule e consistenti spazi intercellulari (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). A livello cellulare si osserva una moderata solubilizzazione e depolimerizzazione delle pectine ed una lieve riduzione del peso molecolare delle emicellulose (Posé *et al.*, 2011). Studi recenti hanno messo in evidenza come tra gli enzimi implicati nel rammollimento, quelli pectolitici abbiano un ruolo preponderante (Posé *et al.*, 2011). L'attenzione è stata posta sugli enzimi pectato liasi (PL) e poligalatturonasi (PG), dei quali il primo catalizza il taglio delle pectine de-esterificate mediante una reazione di β -eliminazione, mentre il secondo depolimerizza le pectine attraverso un taglio idrolitico. L'impiego della tecnologia antisense, per ridurre l'espressione dei geni codificanti i due enzimi, ha determinato la produzione di linee transgeniche i cui frutti presentano un ridotto rammollimento (Jiménez-Bermudez *et al.*, 2002; Quesada *et al.*, 2009). Il silenziamento dei due geni produce simili effetti anche a livello cellulare dal momento che, in entrambi i casi, si osserva una ridotta solubilizzazione e depolimerizzazione delle pectine (Santiago-Doménech *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2009). Tra gli altri enzimi studiati in fragola, potenzialmente implicati nel metabolismo delle pareti cellulari, è importante ricordare le endo- β -1,4-glucanasi che idrolizzano i legami di tipo D-Glc- β -1,4-D-Glc presenti all'interno di polimeri quali gli xiloglucani (emicellulose) e le regioni non cristalline della cellulosa (Brummel *and* Harpster 2001). Il possibile coinvolgimento di questi enzimi nel rammollimento è stato messo in evidenza da un significativo aumento durante la maturazione, sia dell'attività enzimatica (Figuroa *et al.*, 2010), sia dell'espressione di due geni, *FaEG1* ed *FaEG3*, responsabili dell'attività endoglucanasica nel frutto (Trainotti *et al.*, 1999). Tuttavia, il silenziamento mediante costrutti antisense di entrambi i geni non ha determinato significative variazioni nel rammollimento dei frutti, ad indicare che questi enzimi probabilmente pur contribuendo a questo processo non hanno un ruolo centrale (Woolley *et al.*, 2001; Mercado *et al.*, 2010).

La colorazione del frutto di fragola è dovuta all'accumulo delle antocianine pelargonidina 3-glucoside e cianidina 3-glucoside nei vacuoli delle cellule epidermiche e parenchimatiche del ricettacolo (Perkins-Veazie 1995; Lunkenbein *et al.*, 2006). Questa classe di pigmenti, insieme agli isoflavoni, ai flavonoli ed alle proantocianidine, fa parte dei flavonoidi, i quali a loro volta appartengono al più ampio gruppo dei composti fenolici

(Taiz *and* Zeiger 2006). Questi metaboliti secondari svolgono ruoli di fondamentale importanza nel frutto dal momento che, oltre ad intervenire nel determinare il colore, forniscono protezione sia all'attacco di organismi patogeni che da condizioni ambientali avverse quali l'esposizione ai raggi UV, e prendono parte alla formazione dell'aroma. I composti fenolici vanno incontro a cambiamenti metabolici importanti durante lo sviluppo del frutto di fragola. Infatti le proantocianidine, responsabili dell'astringenza dei frutti immaturi, lasciano posto nel corso della maturazione a derivati dell'acido cinnamico e cumarico, ai flavonoli ed alle antocianine (Lunkenbein *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007). I *pathway* biosintetici che portano alla formazione dei composti fenolici sono stati ampiamente investigati in fragola. Tra gli enzimi studiati è importante menzionare gli enzimi fenilalanina ammonio liasi (PAL) e calcione sintasi (CHS), i quali occupano delle posizioni chiave in queste vie biosintetiche. L'enzima fenilalanina ammonio liasi, infatti, è il primo enzima del *pathway* dei fenilpropanoidi, esso catalizza la conversione dell'amminoacido fenilalanina in acido transcinnamico. L'enzima CHS, invece, interviene più a valle, catalizzando la sintesi di naringenina, composto precursore dei flavonoidi sopramenzionati. Entrambi questi enzimi sono codificati da famiglie multigeniche i cui membri sono espressi solo in certi tessuti o in certe condizioni ambientali, per entrambi sono stati identificati geni specifici del frutto. In particolare il gene *FaPAL6* mostra un profilo di espressione frutto e maturazione specifico che fa quindi dedurre un suo ruolo nella biosintesi di composti fenolici nel frutto di fragola (Pombo *et al.*, 2011). Mentre per il gene *FaCHS*, il silenziamento mediante un costrutto antisense ha determinato la produzione di frutti caratterizzati da ridotta pigmentazione, dimostrando il suo specifico coinvolgimento nella sintesi delle antocianine del frutto (Lunkenbein *et al.*, 2006).

Nel corso della maturazione del frutto di fragola vi è un significativo aumento del contenuto in soluti solidi, tra questi i più abbondanti (dall'80 al 90%) sono gli zuccheri ed in particolare il saccarosio, il fruttosio ed il glucosio (Perkins-Veazie, 1995). Tra i soluti solidi sono importanti anche gli acidi organici, quelli maggiormente presenti sono l'acido citrico, l'acido malico e l'acido ascorbico (Perkins-Veazie, 1995). Particolare attenzione è stata rivolta all'acido ascorbico (vitamina C), data la sua rilevanza per la salute umana. Recentemente, mediante l'analisi di espressione di geni codificanti enzimi coinvolti in diverse vie biosintetiche dell'acido ascorbico, si è cercato di definirne il relativo contributo alla produzione di vitamina C nel frutto (Cruz-Rus *et al.*, 2011). Questo studio ha attribuito un ruolo di regolazione importante all'enzima D-galatturonato reduttasi (GalUR), il quale interviene nella produzione di acido ascorbico attraverso la riduzione NAD(P)H dipendente dell'acido galatturonico (Agius *et al.*, 2003), una delle maggiori componenti della componente pectica delle pareti cellulari. Risulta comunque chiaro come la sintesi di vitamina C sia sottoposta ad una complessa regolazione in cui intervengono anche altre vie biosintetiche (Cruz-Rus *et al.*, 2011).

Il contenuto di zuccheri e di acidi organici ed in particolare il loro rapporto giocano un ruolo chiave nel determinare le caratteristiche organolettiche del frutto dal momento che, insieme ai composti volatili, essi contribuiscono alla definizione dell'aroma. I composti volatili, prodotti durante la maturazione del frutto di fragola, sono stati studiati in modo approfondito e ne sono stati identificati più di 300. Questi possono essere raggruppati in diverse classi di composti chimici, che includono aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, lattoni, furani, terpeni, β -D-glucopiranosidi e composti aromatici tra i quali si annoverano alcuni composti fenolici (Zebetakis *and* Holden, 1997). E' stato anche dimostrato come solo una minima parte di questi composti (15-20) sia essenziale a determinare le qualità sensoriali del frutto di fragola (Schieberle *and* Hoffman 1997). Tra queste sostanze volatili, la più importante è il 4-idrossi-2,5-dimetil-3(2H)furanone (furaneolo, HDMF), principalmente a causa della sua elevata concentrazione. Sebbene non siano ancora conosciuti i dettagli biosintetici, è noto che il furaneolo viene prodotto a partire dal D-fruttosio-1,6-difosfato ed è stato anche identificato un enzima, una chinone reductasi (FaQR), che interviene nella sua produzione (Raab *et al.*, 2006).

1.2.3 La regolazione ormonale della maturazione del frutto di fragola

La fragola è classificata come un frutto non climaterico, l'inizio della maturazione non è infatti associato né ad un climaterio respiratorio, né ad un climaterio etilenico (Given *et al.*, 1998). Tuttavia è stato dimostrato che nel corso della maturazione del frutto vi è un aumento nella concentrazione di questo ormone (Iannetta *et al.*, 2006). Nel frutto sono stati inoltre identificati alcuni geni coinvolti nella produzione e percezione dell'etilene, il cui profilo di espressione è ben correlato ai dati di produzione ormonale (Trainotti *et al.*, 2005). E' stato proposto che tale ormone possa controllare almeno alcuni aspetti della maturazione (Trainotti *et al.*, 2005), anche se, ad oggi, non ci sono dati funzionali disponibili.

A differenza dell'etilene, il coinvolgimento dell'auxina nella maturazione è stato studiato in modo più approfondito. Studi fisiologici condotti negli anni '50 del secolo scorso hanno messo in evidenza come la crescita del ricettacolo sia regolata dall'auxina prodotta dagli acheni (Nitsch, 1950). Successivamente è stato dimostrato come l'ormone prodotto dagli acheni abbia anche il ruolo di inibire la maturazione del ricettacolo (Given *et al.*, 1988). Attualmente si ritiene che durante lo sviluppo del frutto la concentrazione di auxina negli acheni, e di conseguenza nel ricettacolo, diminuisca fino a raggiungere una soglia critica che permette l'inizio della maturazione. Questa idea è supportata dalle misure di auxina nei frutti, secondo le quali l'ormone raggiunge la massima concentrazione nel frutto verde per poi diminuire (Symons *et al.*, 2012). Diversi dati riportati in letteratura sottolineano come la rimozione degli acheni da frutti verdi sia in grado di indurre l'espressione di geni correlati alla sindrome di maturazione (ad esempio i sopra-menzionati *FaPL*, *FaPG* e

FaQR), questa induzione viene parzialmente inibita dal trattamento dei ricettacoli con l'auxina sintetica NAA (acido naftalenacetico), ad indicare che l'espressione di questi geni è regolata negativamente dall'auxina (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Quesada *et al.*, 2009; Raab *et al.*, 2006). Uno studio di espressione mediante microarray ha dimostrato come 30 di 45 geni correlati alla sindrome di maturazione siano repressi dall'auxina, confermandone il ruolo di regolatore negativo della maturazione (Aharoni *and* O'Connell, 2002).

Come già accennato nell'introduzione generale, un altro ormone per il quale è stato proposto un ruolo di regolazione della maturazione del frutto di fragola è l'acido abscissico. La concentrazione di questo ormone cresce durante il corso dello sviluppo e della maturazione del frutto per raggiungere un massimo nello stadio rosso; gli studi volti a quantificarlo hanno anche dimostrato che, in maniera simile a quanto riportato per l'auxina, la massima concentrazione di ABA è presente negli acheni (Archbold *and* Dennis, 1985; Chen *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012). La possibile funzione dell'ABA come regolatore positivo della maturazione è stata evidenziata da esperimenti di trattamento dei frutti con l'ormone esogeno, in seguito ai quali sono stati osservati un'accelerazione della maturazione ed un aumento nell'accumulo di antocianine e composti fenolici (Jiang *and* Joyce 2003, Chen *et al.*, 2011, Jia *et al.*, 2011). Recentemente il coinvolgimento dell'ABA nella maturazione di fragola è stato confermato mediante dati molecolari. Infatti, in seguito al silenziamento mediante *RNA interference* dell'espressione del gene codificante l'enzima biosintetico FaNCED e dei geni codificanti due putativi recettori dell'ormone (FaPYR1, FaCHLH/ABAR), è stata osservata una riduzione della pigmentazione dei frutti, che nel caso dell'esperimento relativo all'enzima biosintetico, può essere ripristinata mediante trattamento con ABA esogeno (Chen *et al.*, 2011, Jia *et al.*, 2011).

Nel tentativo di disegnare un quadro completo relativamente alla regolazione ormonale della maturazione, alcuni recenti studi hanno cercato di analizzare il possibile coinvolgimento anche delle giberelline e dei brassinosteroidi nella maturazione, dal momento che precedenti analisi fisiologiche per le prime (Martinez *et al.*, 1996), e dati ottenuti in vite per i secondi (Symons *et al.*, 2006), sembravano indicare un ruolo in tal senso. Per quanto concerne le giberelline, la quantificazione di varie forme bioattive, insieme allo studio di geni implicati nella produzione e nella via di trasduzione del segnale, ha portato a concludere che esse intervengono nello sviluppo del ricettacolo piuttosto che nella maturazione (Csukasi *et al.*, 2011, Symons *et al.*, 2012). Meno chiaro è il quadro per i brassinosteroidi dato che l'espressione di geni implicati nella trasduzione del segnale cresce nel corso della maturazione, mentre vi è un calo della corrispondente attività ormonale (Symons *et al.*, 2012).

I dati ad oggi disponibili in letteratura sembrano pertanto imputare all'auxina ed all'ABA un ruolo chiave nella regolazione della maturazione del frutto di fragola, è stato anche

proposto che il rapporto tra le concentrazioni dei due ormoni possa essere parte integrante del segnale in grado di dare inizio alla maturazione (Archbold *and* Dennis, 1984; Perkins-Veazie, 1995).

1.2.4 La regolazione trascrizionale della maturazione del frutto di fragola

Nonostante la sindrome di maturazione del frutto di fragola sia abbastanza ben conosciuta, pochi studi hanno cercato di approfondirne la regolazione trascrizionale. Fino ad oggi sono stati identificati soltanto due fattori di trascrizione MYB di tipo R2R3 ed un fattore di trascrizione di tipo MADS-box per i quali è stato ipotizzato un ruolo in questa direzione. FaMYB1, il primo dei due fattori di trascrizione MYB ad essere stato identificato, è codificato da un gene caratterizzato da un profilo di espressione crescente nel corso della maturazione. Dal momento che la sua sovra-espressione in tabacco determina una riduzione della pigmentazione dei fiori, è stato proposto che esso possa regolare i livelli di antocianine e flavonoidi prodotti nelle ultime fasi della maturazione, agendo come repressore (Aharoni *et al.*, 2001), anche se ad oggi non sono disponibili studi funzionali che confermino tale ipotesi. Anche FaMYB10, l'altro fattore di trascrizione MYB identificato, è codificato da un gene la cui espressione aumenta nel corso della maturazione. Tuttavia, i trascritti di *FaMYB10* sono assai più abbondanti di quelli del gene *FaMYB1*, inoltre la sua sovra-espressione in fragola, sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV 35S, determina un sovra-accumulo di antocianine nel frutto oltre che la produzione di tali pigmenti anche in fiori, foglie e radici dove sono normalmente assenti, ad indicare un ruolo diretto nella produzione di antocianine (Lin-Wang *et al.*, 2010).

Infine, come già citato nel paragrafo 1.1.6, il gene MADS-box per il quale è stato proposto un ruolo durante la maturazione di fragola, è un gene di tipo *SEPALLATA*. Il silenziamento di questo gene, per mezzo dell'uso di un costrutto antisense, interferisce con la corretta maturazione sia degli acheni che del ricettacolo, in quest'ultimo, in particolare, si osserva una marcata riduzione del rammollimento (Seymour *et al.*, 2011).

E' stato isolato anche un'altro gene MADS-box dal frutto di fragola, *STAG1*, ortologo del gene *AGAMOUS* di *Arabidopsis*, (Rosin *et al.*, 2003) tuttavia non sono stati pubblicati dati relativi ad una sua eventuale caratterizzazione funzionale

Risulta chiaro che lo studio del *network* molecolare che sottende alla maturazione del frutto di fragola è ancora agli albori, la parte del presente lavoro di tesi relativo alla caratterizzazione di un gene MADS-box di classe C di fragola si inserisce proprio in questo panorama, e si propone di contribuire a far luce in questa parte ancora poco esplorata della biologia della maturazione della fragola.

1.3 *Solanum lycopersicum*

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia *Solanaceae* che oltre ad avere una grande rilevanza economica, rappresenta un buon sistema modello per scopi di ricerca. Trattasi infatti di una pianta semplice da coltivare, caratterizzata da un ciclo vitale relativamente breve e che può essere manipolata geneticamente impiegando metodiche di ingegneria genetica diventate oramai di routine. E' inoltre disponibile una vasta serie di mutanti che interessano in modo particolare lo sviluppo e la maturazione del frutto che hanno contribuito a rendere il pomodoro il sistema di eccellenza per lo studio dello sviluppo dei frutti carnosi (Seymour *et al.*, 2012). Inoltre, recentemente, è stato pubblicato il genoma (The Tomato Genome Consortium, 2012) il quale fornisce un importante strumento per far luce su aspetti ancora poco chiari della biologia di questo organismo.

1.3.1 La regolazione trascrizionale della maturazione del frutto di pomodoro

La maturazione del frutto è senza dubbio la fase di sviluppo che è stata più ampiamente investigata. Essa comincia al termine della crescita dimensionale del frutto, quando la comparsa dei primi segni di pigmentazione indica l'inizio dei cambiamenti caratteristici della sindrome di maturazione (paragrafo 1.1.2). Come già anticipato nell'introduzione generale, lo studio di una serie di mutanti (*rin*, *nor*, e *cnr*) i cui frutti non producono etilene e non sono in grado di maturare, neppure se trattati con etilene esogeno, ha aperto la strada all'identificazione di un complesso *network* trascrizionale che agisce a monte dell'etilene (Klee and Giovannoni, 2011).

I geni mutati nei diversi mutanti codificano per vari tipi di fattori di trascrizione. In particolare nel pomodoro *nor* (*non-ripening*) è mutato un gene codificante per un fattore di trascrizione di tipo NAC (NAM/ATAF1/CUC2) (Osorio *et al.*, 2011). Nel caso del pomodoro *cnr* (*colorless non-ripening*) è stato dimostrato che il fenotipo è dovuto ad una mutazione di tipo epigenetico che altera la metilazione del promotore di un fattore di trascrizione di tipo SPBP (Squamosa Promoter Binding Protein) (Manning *et al.*, 2006). Infine, nel mutante *rin*, una delezione spontanea rimuove l'esone finale di un gene codificante per un fattore di trascrizione MADS-box (Vrebalov *et al.*, 2002). Quest'ultimo gene ed i suoi effetti sulla maturazione sono stati studiati di recente in modo molto approfondito mediante l'impiego di esperimenti di trascrittomica, proteomica, metabolomica e immunoprecipitazione della cromatina, ed attualmente si ritiene che esso svolga la funzione di *master gene* nella regolazione della maturazione (Martel *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2011). E' stato infatti dimostrato che *RIN* è in grado di interagire con i promotori di geni coinvolti nella biosintesi e percezione dell'etilene (geni *ACS* ed il

recettore *NR* (paragrafo 1.1.3), nel metabolismo delle pareti cellulari, nella biosintesi dei carotenoidi, nonché nella produzione dell'aroma (Martel *et al.*, 2011; Fujisawa *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2012). Secondo questi ultimi studi, *RIN* agisce a valle di *NOR* (Osorio *et al.*, 2011), inoltre perché *RIN* espliciti la propria funzione di regolatore è necessaria la funzionalità del prodotto del gene *CNR* (Martel *et al.*, 2011).

Accanto a questi tre geni, altri geni codificanti fattori di trascrizione sono stati caratterizzati con approcci di *reverse genetics*: *LeHB-1*, *SIAP2a*, *TAGL1*, *FUL1* e *FUL2*. Il primo dei tre codifica per un fattore di trascrizione di tipo Homeodomain Leucine Zipper (HD-Zip) di classe I, il quale, quando silenziato, determina una riduzione nell'espressione di *ACO1* (paragrafo 1.3.1) ed un drastico rallentamento della maturazione (Lin *et al.*, 2008b). *SIAP2a* codifica invece per un fattore di trascrizione di tipo APETALA2/ERF per il quale è stato proposto un ruolo come regolatore negativo della produzione di etilene e della maturazione (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011). Infine *TAGL1*, *FUL1* e *FUL2*, come già indicato nel paragrafo 1.1.6, codificano per fattori di trascrizione di tipo MADS-box. *TAGL1* sembra intervenire nel controllo di aspetti della maturazione etilene-dipendenti mentre *FUL1* e *FUL2* in aspetti etilene indipendenti (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010; Bemer *et al.*, 2012). Nonostante la caratterizzazione funzionale di questi fattori trascrizionali, il *network* molecolare che regola la maturazione di pomodoro non è stato ancora completamente definito, la ricerca in questo campo sta ora cercando di definire quali siano le relazioni molecolari tra gli interattori identificati.

1.3.2 I geni MADS-box di pomodoro

Oltre ai geni MADS-box per i quali è stato definito un ruolo durante le fasi terminali dello sviluppo del frutto, sono stati ad oggi funzionalmente caratterizzati altri geni MADS-box di pomodoro che intervengono in particolare nello sviluppo del fiore. Studi di mutanti omeotici e l'analisi di piante transgeniche hanno permesso di definire la validità del "modello ABC" anche in pomodoro (Lozano *et al.*, 2009). Il gene MADS-box che svolge la funzione A è il gene *MACROCALIX* (*MC*), ortologo del gene *API* di *A.thaliana*. Questo gene è espresso nell'infiorescenza, nei sepali e nei petali (Hilemann *et al.*, 2006) ed il suo silenziamento determina la conversione dei sepali in strutture fogliacee (Vrebalov *et al.*, 2002), indicando dunque un suo ruolo nello sviluppo dei sepali. Più complessa è la situazione nel caso della funzione B, in pomodoro sono infatti presenti ben 4 geni appartenenti a questa classe: *TAP3* e *TM6* fanno parte della sottofamiglia *DEF* mentre *SIGLO1* e *SIGLO2* appartengono alla sottofamiglia *GLO*. Il silenziamento di *TAP3* e di *SIGLO1* e *SIGLO2* determina la conversione omeotica degli stami in carpelli e dei petali in sepali indicando un ruolo per questi geni nello sviluppo di entrambe le strutture (Geuten and Irish, 2010; De Martino *et al.*, 2006). Nel caso di *TM6*, invece, il silenziamento causa

alterazioni unicamente a carico degli stami suggerendo una limitazione della sua funzione al terzo verticillo florale. Per quanto riguarda infine la funzione C, in pomodoro sono presenti due geni appartenenti alla sottofamiglia *AGAMOUS*: *TAG1* e *TAGL1*. Il primo dei due geni è l'ortologo del gene *AG* di *A.thaliana*, il quale interviene nel determinare lo sviluppo sia del terzo che del quarto verticillo florale. Il suo silenziamento, mediante *RNA interference*, determina infatti difetti a carico dello sviluppo degli stami che producono un ridotto quantitativo di polline ed una perdita di determinazione del fiore con un caratteristico fenotipo di "frutto dentro al frutto" (Pan *et al.*, 2010). Il silenziamento del gene *TAGL1* che, come indicato in precedenza, interviene nella regolazione nella maturazione del frutto, non ha invece effetti sul fiore (Pan *et al.*, 2010). Tuttavia il fatto che i frutti sotto-esprimenti *TAGL1* presentino un ridotto pericarpo (Itkin *et al.*, 2009), insieme al fatto che la sovra-espressione determini la conversione dei sepalì in strutture carnose, suggerisce un possibile ruolo di questo gene nello sviluppo del carpello; inoltre i frutti sovra-esprimenti *TAGL1* presentano anche la conversione dei petali in strutture simili agli stami ad indicare un possibile ruolo anche nel controllo dell'identità degli stami (Gimenez *et al.*, 2010; Vrebalov *et al.*, 2009).

Accanto ai geni implicati nel controllo dello sviluppo di fiore e frutto vi è un altro gene MADS-box di pomodoro che è stato ampiamente studiato, trattasi di *JOINTLESS*, il quale appartiene alla sottofamiglia *STMADS11* e svolge un ruolo importante nel definire lo sviluppo della zona di abscissione del peduncolo (Mao *et al.*, 2000).

Sebbene, come descritto, vi siano svariati geni MADS-box di pomodoro che sono stati funzionalmente caratterizzati, ve ne sono molti altri per i quali è ad oggi disponibile unicamente il pattern di espressione (Hilemann *et al.*, 2006). Uno di questi è il gene *TM8* di cui mi sono occupata nella seconda parte di questo lavoro. Considerata l'importanza del pomodoro quale organismo modello è chiaro che qualsiasi nuova scoperta relativa alla biologia del suo sviluppo risulta di fondamentale importanza per la comunità scientifica.

2. Scopo del lavoro

Capire i meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo e la maturazione dei frutti carnosi è importante oltre che per i risvolti economici di questi processi fisiologici anche da un punto di vista evolutivo. Sebbene fiore e frutto rappresentino caratteristiche peculiari delle Angiosperme, ci sono alcune specie di Gimnosperme che circondano i propri semi con strutture carnose le quali possono essere assimilate ai veri frutti sotto il profilo funzionale, dal momento che condividono con i frutti delle Angiosperme la funzione di dispersione dei semi nell'ambiente. Uno studio recentemente condotto dal mio gruppo di ricerca (Lovisetto *et al.*, 2012) ha messo in evidenza come alcuni dei meccanismi molecolari di base coinvolti nella formazione dei frutti carnosi siano conservati sia nelle Gimnosperme che nelle Angiosperme, suggerendo che tali *network* molecolari si siano sviluppati indipendentemente dalla presenza del fiore. In particolare, è stato scoperto che geni MADS-box, dello stesso tipo di altri geni per i quali è già stato definito un ruolo durante lo sviluppo dei veri frutti, vengono espressi anche durante lo sviluppo delle strutture carnose associate ai semi di *Ginkgo biloba* e *Taxus baccata*. Sarebbe assai interessante caratterizzare funzionalmente questi ultimi geni, tuttavia le Gimnosperme sono piante recalcitranti sia alla rigenerazione che alla trasformazione. Quindi, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare due geni di Angiosperme, omologhi dei geni identificati nei "frutti" delle Gimnosperme, per capire quale possa essere il ruolo da essi svolto nello sviluppo e maturazione dei frutti. In particolare è stata condotta l'analisi funzionale di un gene di classe C di fragola (*FaSHP*) e del gene *TM8* di pomodoro. La fragola rappresenta un buon sistema sperimentale per questo tipo di studio dal momento che è un falso frutto come le strutture carnose delle Gimnosperme; il pomodoro costituisce invece l'attuale sistema di riferimento per lo studio dello sviluppo dei frutti carnosi. Lo studio dei due geni è stato condotto mediante approcci di *reverse genetics*, in particolare sono stati effettuati degli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione transiente del gene *FaSHP* in frutti di fragola, mentre sono state prodotte piante transgeniche di pomodoro sovra-esprimenti *TM8* e la fusione *TM8::SRDX*, ovvero il gene nella forma di repressore trascrizionale. Questi esperimenti hanno permesso di far luce sul ruolo di *FaSHP* durante la maturazione del frutto di fragola e sulla funzione svolta da *TM8* sia nello sviluppo vegetativo che riproduttivo della pianta.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Soluzioni e terreni

DENHARDT 100X: BSA 2% (p/v), ficoll 400 2% (p/v), polivinilpirrolidone 2% (p/v).

SSC 1X: NaCl 0,15 M, citrato di sodio 0,015 M pH 7,0.

SM: NaCl 0,1 M, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

TAE 1X: Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0.

Terreno LB: NaCl 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, peptone 10 g/l, pH 7,0.

Terreno NZY: idrolisato di caseina 10 g/l, NaCl 5 g/l, estratto di lievito 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 2g/l, pH 7,0.

Terreno SOC: peptone 20 g/l, estratto di lievito 5 g/l, NaCl 0,5 g/l (10 mM), KCl 0,19 g/l (10 mM), MgCl₂ 0,95 g/l (10 mM), MgSO₄ 1,2 g/l (10 mM), Glucosio 3,6 g/l (20 mM).

Terreno YEB: saccarosio 5 g/l, peptone 5 g/l, estratto di vitello 5 g/l, estratto di lievito 1 g/l, MgSO₄ 0,049 g/l.

Tampone di estrazione del DNA genomico: 1 volume di tampone di estrazione di DNA (sorbitolo 0,35 M, Tris-base 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 8), 1 volume di tampone di lisi dei nuclei (Tris 0,2 M, EDTA 0,05 M, NaCl 2M, CTAB 2%(p/v)), 0,4 volumi di sarcosile 5% (p/v), 3,8 mg/ml di sodio bisolfito.

Tampone di estrazione CTAB: CTAB 2% (p/v), polivinilpirrolidone K30 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM pH 8; EDTA 25 mM pH 8, NaCl 2 M, spermidina 0,5 g/L, β-mercaptoetanol 2% (v/v).

Terreno MMA: sali MS 4,3 g/l, MES 2,13 g/l, saccarosio 20 g/l, pH5,6.

Terreno OMS: sali MS 4,3 g/l, vitamine Morel 1000X 1 ml/l, myoinositolo 0,1 g/l, glicina 2 mg/l, glucosio 20 g/l, MES 0,5 g/l, pH5,5.

Terreno 1/2 MS: sali MS 2,15g/l, vitamine Morel 1000X 0,5 ml/l; myoinositolo 0,05 g/l, glicina 1 mg/l, saccarosio 10g/l, agar 5 g/l, pH 5,8.

Terreno T210: sali MS 4,3 g/l, vitamine B5 1000x 1 ml/l, MES 0,5 g/l, glucosio 30 g/l, IAA 0,1 mg/l, zeatina 1 mg/l, agar 5,4 g/l, pH 5,8.

Terreno T21: sali MS 4,3 g/l, vitamine B5 1000x 1 ml/l, glucosio 30 g/l, 6-BAP 0,5 mg/l, IAA 0,1 mg/l, zeatina 1 mg/l, agar 5,4 g/l, pH 5,8.

Vitamine Morel 1000X : tiamina HCl 1 g/l, piridossina HCl 1 g/l, Ca pantotenato 1 g/l, acido nicotinico 1 g/l, biotina 0,1 g/l.

Vitamine B5 1000X : tiamina HCl 10 g/l, piridossina HCl 1 g/l, acido nicotinico 1 g/l.

3.1.2 Materiale vegetale

Fragola: gli studi di espressione (paragrafo 3.2.3), le agroinfiltrazioni (paragrafo 3.2.14) ed i trattamenti ormonali (paragrafo 3.2.16) sono stati condotti utilizzando quale materiale biologico foglie, fiori interi e frutti (secondo gli stadi di sviluppo riportati nella figura 3.1) provenienti da diverse piante di fragola (*Fragaria x ananassa*, cultivar *Elsanta*) gentilmente fornite dalla cooperativa Sant'Orsola di Pergine (Trento).



Figura 3.1: Foglia (L), fiore (F) e frutti di fragola agli stadi di sviluppo considerati nel presente lavoro sperimentale: verde piccolo (G1), verde grande 1 [G2(1)], verde grande 2 [G2(2)], bianco 1 (W1), bianco 2 (W2), rosa (P) e rosso (R).

Pomodoro: per la produzione di piante transgeniche (paragrafo 3.2.15) sono state impiegate piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) appartenenti alla cultivar *Florida Petite*. Esse hanno la caratteristica di avere ridotte dimensioni, il che ne facilita la manipolazione *in vitro* e la coltivazione in ambiente confinato. Le piante sono state fatte crescere, impiegando gli appropriati mezzi di coltura, in contenitori sterili, alla temperatura di 25° C con un fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 ore di buio. Dopo la radicazione le piante sono state trasferite in terriccio commerciale e coltivate in serra confinata (Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova) con il medesimo fotoperiodo. Il materiale vegetale (foglie, fiori, peduncoli dei fiori, frutti), destinato alle analisi molecolari, è stato campionato secondo gli stadi di sviluppo riportati nella figura 3.2.



Figura 3.2: Foglia (L), peduncolo florale (FP), fiore (F), organi dei quattro verticilli fiorali (sepali (se), petali (pe), stami (st), ovari (ov)) e frutti di pomodoro agli stadi di sviluppo verde piccolo (10 giorni dopo l'antesi) (SG), verde maturo (G), breaker (B) e rosso (R).

Tutto il materiale vegetale raccolto è stato congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.1.3 Oligonucleotidi

Nelle reazioni di amplificazione a catena della polimerasi (PCR) condotte nel contesto degli esperimenti di *screening* della libreria di fragola (paragrafo 3.2.8), nei clonaggi (3.2.12) e per l'analisi delle piante trasformate prodotte, sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco opportunamente disegnati e riportati nella tabella 3.1.

| OLIGONUCLEOTIDE | SEQUENZA 5'-3' | UTILIZZO |
|--------------------|--|--|
| FaSHP_ctg7_for2 | GGCACAGCAGCAGCAAGCAAATA | <i>Screening</i> libreria di cDNA di fragola |
| FaSHP_ctg7_rev2 | AGAGGCGGAATAAATCACCAGACT | |
| FaSHP_iRNA_for | AAATCTAGAGAATTCGTCCGCGTA TGAGCAACCAAT XbaI EcoRI | <i>RNA interference</i> del gene <i>FaSHP</i> |
| FaSHP_iRNA_rev | AAAAGCTTGGTACCCAAGGAGTG CCTGGCTAGTTC HindIII KpnI | |
| FaCHS_iRNA_for | AAATCTAGAGAATTCCTCAGCGG CCCAAATATCCTT XbaI EcoRI | <i>RNA interference</i> del gene <i>FaCHS</i> |
| FaCHS_iRNA_rev | AAAAGCTTGGTACCCCTCTCCG GTGGTCTTG HindIII KpnI | |
| FaSHP_DIR | GGCACGAGAACTAAGGATATTC | Sovra-espressione del gene <i>FaSHP</i> |
| FaSHP_CDS_rev | CTGGTGATTTATTCCGCCTCT | |
| TM8_CDS_for | CATTTGAAGAATGGGGAGAG | Sovra-espressione del gene <i>TM8</i> e della chimera <i>TM8::SRDX</i> |
| TM8_CDS_rev | AGGTAGCAATTGAAGCTCTG | |
| TM8_CDSrev_SRDX | TTTTTAAGCGAAACCCAAACGGAG TTCTAGATCCAGATCGAGTCCCTTA GAAAGTAACTC SRDX | |
| CaMV35S_for | GGGGAATTCGGTGGCTCCTACAAA TG | Analisi piante di pomodoro trasformate (oligonucleotide senso promotore CaMV35S) |
| FaSHPpromoter_rev | CTCCATGATAATTTGCGAAGATGA | Clonaggio del promotore del gene <i>FaSHP</i> |
| FaSHPpromoter_for3 | TTGCCAACCAATGAACGGTGTG | |

Tabella 3.1: Oligonucleotidi innesco utilizzati nelle reazioni di PCR

Nella tabella 3.2 sono invece riportati gli oligonucleotidi impiegati per le analisi di espressione mediante *real-time* PCR (paragrafo 3.2.3).

| OLIGONUCLEOTIDE | SEQUENZA 5'-3' | UTILIZZO |
|------------------------|--------------------------|--|
| FaSHP_ITS_rtfor | CGTCACGCGGTTGGCATAAATAC | Normalizzatore di fragola (FJ356167) |
| FaSHP_ITS_rtrev | GACGCGCTCACGGCTAAGGAA | |
| FaSHP_rtfor2 | GGCACAGCAGCAGCAAGCAAATA | Profilo di espressione del gene <i>FaSHP</i> |
| FaSHP_rtrev2 | CTTGGCGATTGTAATTGTGATTGG | |
| FaSHP_rtiRNAfor | TGGAGAAAGGGATCAGCAGAATAA | Analisi di espressione del gene <i>FaSHP</i> nei frutti agroinfiltrati |
| FaCHS_rtiRNArev | TATGCTGCCAGGAACATCGTCCG | |
| FaCHS_rtfor1 | GCCCGTCCGTCCGTCAAGCGTCTC | Analisi di espressione del gene <i>FaCHS</i> (AI795154) |
| FaCHS_rtrev1 | CTAGGCCACGGAAGGTCACG | |
| FaPAL6_rtfor | GACAAGGTGTTCAACGCAATCTGC | Analisi di espressione del gene <i>FaPAL6</i> (HM641823) |
| FaPAL6_rtrev | AATCAAACCAATTCAGCCAAAAG | |
| FaEG1_rtfor1 | GCGTACAGCTCCAGCCTCAAAAA | Analisi di espressione del gene <i>FaEG1</i> (AJ00634) |
| FaEG1_rtrev1 | ATTCTCTGTACTGCCGCTTCTCG | |
| FaPG1_rtfor | TCGGAAGTCTCGGAAGATACGACA | Analisi di espressione del gene <i>FaPG1</i> (AY282613) |
| FaPG1_rtrev | CGAGGCGGTGGTAGCTTTAGGA | |
| FaPL_rtfor | CCATATTCGGATCTAGCCACATTT | Analisi di espressione del gene <i>FaPL</i> (U63550) |
| FaPL_rtrev | AGGAGTCACTATGCCCAACAGC | |
| FaGalUR_rtfor1 | TGCCCAAGCCAAAGGAAAATCAAC | Analisi di espressione del gene <i>FaGalUR</i> (AF139082) |
| FaGalUR_rtrev1 | TCCTCCTCGGTCAAGCAGAAGTCG | |
| FaQR_rtfor1 | CCTTGGGTGCTGCTGATTG | Analisi di espressione del gene <i>FaQR</i> (AY048861) |
| FaQR_rtrev1 | GTGGCGTTGCTGGACCTACTATT | |
| STAG1_rtfor | CTGCCAAGCTGCATAACCAGATA | Analisi di espressione del gene <i>STAG1</i> (AF168468.1) |
| STAG1_rtrev | ATTTCCGCAAACAAGAGTTCATTC | |
| FaMads9_rtfor1a | AGCCAACAGAGATTTGAAAACGAA | Analisi di espressione del gene <i>FaMads9</i> (AF484683) |
| FaMads9_rtrev1a | AGGCTGGAACATAAGTCCCTGTGT | |
| FaMYB1_rtfor1 | GCTGTTTGGTGCCTGAGTTGAATC | Analisi di espressione del gene <i>FaMYB1</i> (AF401220.1) |
| FaMYB1_rtrev1 | TAAAAGAAGCCCCGGAGAGGAA | |
| FaMYB10_rtfor2 | TCCAAATAAGCCCATGAGAATAA | Analisi di espressione del gene <i>FaMYB10</i> (EU155162) |
| FaMYB10_rtrev2 | CACCAAACAGCCAGCAGCAGAAT | |
| Tact_rtfor | AGGCACCCCTTAATCCCAAG | Normalizzatore di pomodoro (AB199316) |
| Tact_rtrev | AAGCACAGCCTGGATAGCAAC | |
| TM8_rtfor1 | AGGCGTATCATTTCCGAACA | Analisi di espressione del gene <i>TM8</i> |
| TM8_rtrev1 | TCATCCCTTAGAAAGTAACTCACT | |
| TAG1_rtfor | AAGGAAACTAGGAAGGGGAAAAT | Analisi di espressione del gene <i>TAG1</i> (AY098733) |
| TAG1_rtrev | AACCAAAGCAACCTCAGCATCACA | |
| TAGL1_rtfor | TCAGCCAAATTACGAAGATGC | Analisi di espressione del gene <i>TAGL1</i> (AY098735) |
| TAGL1_rtrev | AAGCTGGAGAGGAGTTTGGTCA | |

| | | |
|-------------------|--------------------------|--|
| TM6_rtfors | AGGCGAGGAACTTAGAAGAGCA | Analisi di espressione del gene <i>TM6</i> (SGNU568929) |
| TM6_rtrevs | TTGGGGTGCAATGGTTGTAGG | |
| LeAP3_rtfors2 | TGAATTTGATGCAAGACAAGAGGA | Analisi di espressione del gene <i>LeAP3</i> (SGN568823) |
| LeAP3_rtrevs2 | TGTTGGGTTGAAGGCGTAAGTCT | |
| SIGLO1_rtfors | ATGCAAATAGAACTCAGGCACCTA | Analisi di espressione del gene <i>SIGLO1</i> (SGN_U569390) |
| SIGLO1_rtrevs | TCCTGCTCCATATTTTGAGTCTTT | |
| SIGLO2_rtfors | GGTTAAGCTCAGGCACCTCAA | Analisi di espressione del gene <i>SIGLO2</i> (SGN_U573183) |
| SIGLO2_rtrevs | AGATTCAGACTGCTTGGCACTG | |
| MC_rtfors2 | GAACTGCAGAAAAGGAAAGAGC | Analisi di espressione del gene <i>MC</i> (AF448521) |
| MC_rtrevs2 | GGCATTGATGTGGTTGTAAGAGG | |
| Jointless_rtfors2 | AGATCTCTTGAACTGGATTGAGC | Analisi di espressione del gene <i>Jointless</i> (SGN-U578103) |
| Jointless_rtrevs2 | CACCTGTTGCCTTAATTTTTTCAT | |
| SlIAA27_rtfors | AATGATGATGAAGGGAGAACAGGT | Analisi di espressione del gene <i>IAA27</i> (JN379450) |
| SlIAA27_rtrevs | TGGAATCTTATCACTGGCACACTG | |
| SlIAA9_rtfors | GCTCTTCCCCTTGACCCTTCC | Analisi di espressione del gene <i>IAA9</i> (JN379437) |
| SlIAA9_rtrevs | TCTCCTTTGTATCACCTGCTTTCA | |
| SlIAA3_rtfors | CAATGATCTTGAGGCAACTGAGC | Analisi di espressione del gene <i>IAA3</i> (JN379433) |
| SlIAA3_rtrevs | TTTGGTGCAGGAGCTGAGTCTT | |
| ACO1_rtfors | TCATACAGACGCAGGAGGCA | Analisi di espressione del gene <i>ACO1</i> (X04792) |
| ACO1_rtrevs | GCATGGGAGGAACATCGATC | |

Tabella 3.2: Oligonucleotidi innesco utilizzati per gli esperimenti di *real-time* PCR

3.2 Metodi

3.2.1. Estrazione di RNA

Per l'estrazione di RNA dai tessuti di fragola e pomodoro è stato utilizzato il protocollo di Chang *et al.* (1993) modificato per ottimizzare la resa. Per eliminare completamente le RNasi prima di procedere all'estrazione, la vetreria è stata posta in stufa a 250°C per 4 ore e le soluzioni sono state trattate con DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% (v/v) e successivamente autoclavate.

A seconda dei tessuti da cui sono state condotte le estrazioni di RNA è stato utilizzato un differente quantitativo di materiale. Nel caso di fiori interi, parti fiorali e peduncoli sono stati pesati circa 50 mg di campione, nel caso invece di frutti e foglie si è fatto uso di 2 g di

campione. In entrambi i casi il materiale è stato velocemente macinato in presenza di azoto liquido, facendo attenzione a non scongelarlo e a macinarlo il più finemente possibile.

Nel caso delle estrazioni con ridotto materiale di partenza, ai tessuti macinati sono stati aggiunti 750 μ l di tampone di estrazione CTAB preriscaldato a 65°C, nel caso invece, delle altre estrazioni, il materiale è stato trasferito in una provetta falcon da 50 mL contenente 20 mL dello stesso tampone. Dopo aver agitato vigorosamente è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio - alcool isoamilico 24:1 (v/v), si è mescolato per 20 minuti e quindi sottoposto il tutto a centrifugazione a 4000 x g per 20 minuti. Il sovranatante è stato dunque prelevato e sottoposto a estrazione con cloroformio - alcool isoamilico per altre due volte. Dal sovrinatante dell'ultima estrazione si è proceduto alla precipitazione dell'RNA aggiungendo LiCl in quantitativo tale da ottenere una soluzione 2 M. La precipitazione è stata effettuata in ghiaccio per una notte intera. Questo trattamento permette la precipitazione selettiva dell'RNA, così che DNA, residui di zuccheri e fenoli rimangono in soluzione.

Successivamente la soluzione è stata sottoposta a centrifugazione a 4000 x g per 80 minuti a 4°C. Il pellet contenente l'RNA è stato lavato con etanolo 80% (v/v) freddo e successivamente risospeso in un volume opportuno di H₂O mQ DEPC 0,1% (v/v).

3.2.2 Purificazione dell'RNA e sintesi del cDNA

Durante le ultime fasi relative all'estrazione dell'RNA una piccola frazione di DNA genomico può precipitare. Per purificare i campioni, è stato dunque effettuato il trattamento con DNAsi, enzima in grado di degradare il DNA, lasciando inalterato l'RNA. Quando questo trattamento si è reso necessario è stata allestita una miscela in un volume finale di 20 μ L contenente: 6 μ g di RNA, *buffer* di reazione (Tris-HCl 40 mM, MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 1 mM) e 2 U dell'enzima DNasi (Promega). La reazione è stata condotta a 37°C per 40 minuti in un termociclatore "Eppendorf Mastercycler S", successivamente l'enzima è stato inattivato sottoponendo la miscela alla temperatura di 70 °C per 10 minuti. Per analizzare l'espressione dei trascritti di interesse risulta necessario retrotrascrivere l'RNA in un'elica complementare di DNA (cDNA). A tal fine si è fatto uso del kit *High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems). Dopo aver riscaldato l'RNA per 10 minuti alla temperatura di 70°C per eliminare eventuali strutture secondarie dello stesso, è stata preparata una miscela di reazione in un volume finale di 50 μ L contenente: 3 μ g di RNA trattati come sopra descritto, *buffer* di reazione 1 X (secondo le indicazioni del produttore), *random primers* (secondo le indicazioni del produttore), dNTPs 4 mM e 5 U dell'enzima *MultiscribeTM Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems). La reazione di sintesi è stata condotta in un termociclatore "Eppendorf Mastercycler S" secondo il seguente ciclo:

- 10 minuti a 25 ° C;
- 2 ore a 37° C.

3.2.3 Real time PCR

Per valutare il livello di espressione dei geni di interesse sono stati effettuati degli esperimenti di *real-time* PCR, una metodologia che permette di rilevare l'abbondanza dei trascritti dei geni in analisi. Questo è possibile monitorando in tempo reale i prodotti di amplificazione, grazie all'analisi dell'incremento di fluorescenza causata dal legame al DNA di un intercalante, il *Syber green* (Applied Biosystems).

La reazione di amplificazione raggiunge una fase esponenziale durante la quale si può determinare un segnale di fluorescenza *threshold* (soglia) al quale tutti i campioni possono essere confrontati. Il numero di cicli di PCR richiesto per generare un segnale significativo è definito come ciclo soglia o Ct. Il valore soglia viene calcolato in funzione del *background* di fluorescenza e corrisponde al punto nel quale il segnale generato dal campione è significativo, cioè più alto rispetto al segnale di fondo. Il valore di Ct è proporzionale al quantitativo di cDNA di partenza e consente di calcolare l'abbondanza di un particolare mRNA nel campione in esame. Trascritti più abbondanti nel campione iniziale vengono rilevati più precocemente durante la reazione di PCR rispetto ai trascritti più rari e quindi vengono associati a Ct più bassi.

Il software effettua in automatico una prima elaborazione dei dati: dall'intensità rilevata del segnale di fluorescenza viene sottratto il rumore di fondo (*baseline*) e tale valore viene utilizzato per il calcolo della fluorescenza normalizzata rispetto ad un riferimento passivo interno che contiene il colorante Rox. Quindi per ogni reazione effettuata il software elabora una curva sigmoide, definita "plot di amplificazione".

La curva di dissociazione, invece, permette di ottenere informazioni sulla dissociazione degli ampliconi di una corsa PCR quantitativa. In ascissa viene riportata la temperatura e in ordinata le variazioni di fluorescenza. La curva di dissociazione viene utilizzata per indagare l'eventuale presenza di prodotti aspecifici di amplificazione. Se viene utilizzata una sola coppia di oligonucleotidi, la curva di dissociazione deve mostrare un solo picco in corrispondenza dell'unico amplicone specifico. La presenza di più picchi individua un amplicone aspecifico dovuto, ad esempio, alla presenza di DNA genomico oppure a dimeri di oligonucleotidi che hanno una temperatura di dissociazione caratteristica, più bassa del prodotto specifico.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando un quantitativo di cDNA (preparato come descritto nel paragrafo 3.2.2) variabile da 1 a 45 ng a seconda del gene da analizzare, 12,5 µL di *Syber Green PCR master mix* (Applied Biosystem), 0,1 pmoli di ogni

oligonucleotide innesco in un volume totale di 25 μL ed eseguite con lo strumento "7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystem).

Le condizioni di PCR applicate sono le seguenti:

- 2 minuti a 50°C;
 - 10 minuti a 95°C ;
 - 15 secondi a 95°C (denaturazione);
 - 15 secondi a 60°C (*annealing*);
 - 34 secondi a 65°C (estensione);
 - 72°C per 2 min.
- } 40 cicli

Al termine della PCR è stata effettuata una curva di dissociazione a partire da 60°C. I valori di Ct, come media di tre repliche calcolate e normalizzate indipendentemente, sono stati analizzati con il programma "7500 System Software". Come controlli endogeni vengono usualmente scelti i geni *housekeeping*, i quali sono presenti in tutte le cellule, perché indispensabili per la loro sopravvivenza. Nel caso delle analisi di espressione in fragola sono state utilizzate le regioni spaziatrici dei geni ribosomali 26S (ITS), nel caso invece delle analisi in pomodoro, è stato utilizzato il gene dell'actina. Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per i vari geni oggetto di studio sono riportate in tabella 3.2.

3.2.4 Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da foglie seguendo il protocollo di Fulton *et al.* (1995) per piccole preparazioni di DNA genomico. Tale protocollo prevede di aggiungere a 50-100 mg di foglie, 250 μL di tampone di estrazione completo (paragrafo 3.1.1), preparato appena prima dell'uso. Dopo aver macinato le foglie in una eppendorf con un apposito micropestello, si sono aggiunti ulteriori 350 μL di tampone di estrazione completo ed i campioni sono stati incubati per almeno 30 minuti a 65°C. Una volta che i campioni si sono raffreddati sono stati addizionati 750 μL di cloroformio - alcool isoamilico (24:1) e gli stessi sono stati poi centrifugati a 16000 x g per 5 minuti. Il DNA contenuto nella fase acquosa è stato precipitato con un uguale volume di isopropanolo, recuperato centrifugando a 16000 x g per 5 min, lavato con etanolo 70% (v/v) ed infine risospeso in Tris-HCl contenente RNAsi A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.5 Quantificazione degli acidi nucleici

Quando necessario la concentrazione degli acidi nucleici è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro "Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 11", programmato per la lettura a tre diverse lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm, 280 nm. La concentrazione espressa in $\text{ng}/\mu\text{L}$ è stata calcolata utilizzando le seguenti formule:

$$[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} * 40 * \text{fattore di diluizione}$$

$$[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} * 50 * \text{fattore di diluizione}$$

I valori ottenuti rappresentano ovviamente una stima poiché la lettura alla lunghezza d'onda di 260 nm corrisponde al picco massimo di assorbimento per le basi azotate e pertanto non è possibile, in base all'assorbanza, distinguere l'RNA dal DNA. Per valutare la presenza di eventuali contaminazioni di tipo proteico o glucidico sono state analizzate le assorbanze rilevate a 280 nm e a 230 nm, le proteine e gli zuccheri presentano, rispettivamente, un picco di assorbimento a tali lunghezze d'onda. Calcolando il rapporto di questi valori con quello misurato a 260 nm è possibile determinare un indice di purezza del materiale. In particolare sono state considerate pure le preparazioni in cui sia il rapporto $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, che quello $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ risultavano maggiori di 1,8. La quantificazione e l'integrità degli acidi nucleici estratti è stata ulteriormente confermata mediante elettroforesi in gel di agarosio, in percentuale opportuna a seconda del campione da analizzare, e successiva colorazione con bromuro d'etidio (0.5 µg/ml). Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone TAE 1X.

3.2.6 Reazioni di PCR

Un potente metodo per amplificare particolari segmenti di DNA è rappresentato dalla reazione di polimerizzazione a catena o PCR (*polymerase chain reaction*), effettuata in vitro ad opera dell'enzima DNA polimerasi.

Le miscele per le reazioni di PCR sono state allestite in un volume di 50 µL contenenti: DNA (15 ng nel caso di cDNA, 1 ng nel caso di DNA plasmidico e 150 ng nel caso di DNA genomico), tampone di reazione ((NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tris HCl (pH 8.8) 67 mM, Tween-20 0.01%), MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 µM di ciascuno degli oligonucleotidi innesco (senso ed antisenso) ed 1 U della DNA polimerasi *EuroTaq* (EuroClone).

Le reazioni sono state effettuate in un termociclatore "Eppendorf Mastercycler S" secondo il seguente ciclo:

- 5 minuti a 95°C ;
 - 20 secondi a 95°C (denaturazione);
 - 20 secondi alla temperatura di *annealing* degli oligonucleotidi in uso;
 - 1 minuto per sintetizzare 1kbp a 72°C (estensione);
 - 72°C per 2 min.
- } 40 cicli

I prodotti di PCR ottenuti sono stati controllati mediante elettroforesi in gel di agarosio, in percentuale opportuna a seconda delle dimensioni attese dell'amplificato, e successiva colorazione con bromuro d'etidio. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone TAE 1X.

3.2.7 Purificazione dei prodotti di PCR

Quando si è reso necessario i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit *EuroGold Gel Extraction kit* (EuroClone). Tale sistema si basa sul legame degli acidi nucleici alla resina di silice-gel in presenza di un agente caotropico. In seguito all'eliminazione dei sali mediante lavaggio della colonna in presenza di etanolo, il DNA è stato eluito in condizioni di ridotta salinità.

In breve, la reazione di PCR da purificare è stata mescolata con un volume di *Binding buffer*, la miscela ottenuta è stata applicata ad una colonnina (*Perfect Bind DNA Column*) inclusa nel kit e sottoposta a centrifugazione a 10000 x g per 1 minuto. Successivamente la colonnina è stata lavata con 750 µL di *Wash Buffer* (contenente etanolo) e sottoposta a centrifugazione a 10000 x g per 1 minuto (questo passaggio è stato ripetuto per due volte). Dopo aver eliminato eventuali residui di etanolo mediante un'ulteriore centrifugazione a 10000 x g per 1 minuto, il DNA è stato eluito in un volume di 30 µL di *Elution buffer* mediante centrifugazione a 5000 x g per 1 minuto.

3.2.8 Screening di una libreria di cDNA

Per isolare il cDNA del gene *FaSHP* di fragola è stato effettuato lo *screening* di una libreria di cDNA preparata da RNA di frutto rosso e clonata in un vettore fagico, *Zap Express Phage Vector* (Stratagene, USA) (Trainotti *et al.*, 1999).

Lo *screening* è stato condotto utilizzando una sonda corrispondente ad un breve frammento della regione codificante del gene (200 nucleotidi) preparata mediante PCR (paragrafo 3.2.6) utilizzando oligonucleotidi disegnati sulle sequenze di EST identificate nei database pubblici (tabella 3.1, paragrafo 4.1.1).

La marcatura della sonda è stata eseguita con il metodo del *random priming* utilizzando il kit *DECAprimeTM II Random Primed DNA Labeling Kit* (Ambion). Dopo aver purificato il prodotto di PCR come descritto nel paragrafo 3.2.7, a 25 ng di DNA si sono aggiunti decanucleotidi random secondo le indicazioni del produttore. La miscela così ottenuta è stata sottoposta a denaturazione mediante incubazione a 95°C per 5 minuti e successivamente è stata posta in ghiaccio. Alla miscela si sono poi aggiunti dNTPs diversi da quello radioattivo, dNTP radioattivo [³²P] (8 µCi), frammento Kleenow della DNA polimerasi I (5U), secondo le indicazioni del produttore. La reazione è stata fatta procedere per 1 ora alla temperatura di 37°C e successivamente bloccata mediante l'aggiunta di EDTA, pH 8.0 alla concentrazione finale di 20 µM. La sonda così marcata è stata purificata attraverso una colonnina di Sephadex G5 per eliminare dNTPs non incorporati ed oligomeri.

Parallelamente alla preparazione della sonda, 10.000 pfu (pfu = unità formanti placca) della libreria sono state aggiunte ad 1 ml di batteri (ceppo XL1-Blue MRF') risospesi in MgSO_4 10 mM ad una OD_{600} di 0,5, e la sospensione batterica è stata incubata a 37°C per 15 minuti per permettere l'infezione fagica; successivamente si è proceduto a piastrare tale sospensione su terreno NZY. Le piastre sono state quindi incubate per una notte alla temperatura di 37°C. Una volta formatesi le placche di lisi, queste sono state trasferite su una membrana di nylon (Hybond N, Amersham) lasciando quest'ultima a contatto con la piastra per 1 min. Successivamente il DNA fagico è stato denaturato ponendo la membrana in una soluzione NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M per 5 minuti., il filtro è stato poi neutralizzato mediante incubazione per ulteriori 5 minuti in una soluzione contenente NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 ed infine lavato con SSC 2X. Dopo aver fatto asciugare la membrana, quest'ultima è stata esposta ai raggi UV per 3 minuti per permettere il fissaggio del DNA.

Il filtro è stato poi preibridato mettendolo a 60° C per 3 ore in una soluzione di SSC 5X, Denhardt's 5X, SDS 5% (p/v), DNA carrier (da sperma di aringa) 100 µg/ml ed in seguito denaturato per riscaldamento a 100°C per 5 minuti in presenza di SDS al 2% (p/v). L'ibridazione è stata effettuata lasciando il filtro per 16 ore a 60° C in una soluzione fresca uguale in composizione a quella di preibridazione alla quale però è stata aggiunta la sonda marcata e precedentemente denaturata per riscaldamento a 100° C. Il filtro è stato in seguito lavato a 60° C con una soluzione di SDS 0,1% (p/v) e con concentrazioni decrescenti di SSC (4X, 2X, 1X) fino ad eliminare dal filtro l'attività aspecifica (i lavaggi sono durati 15 minuti ciascuno). Dopo aver asciugato il filtro all'aria, questo è stato esposto in una lastra autoradiografica a -80° C.

Dall'analisi dei segnali ottenuti nelle lastre si sono individuate le placche di interesse e si sono prelevate dalle piastre le carote di agar contenenti le colonie da analizzare. Le colonie sono state conservate in 500 µl di terreno SM e 20 µl di cloroformio. Dal momento che dal primo *screening* non si ottiene il clone puro, si è proceduto ad un secondo e ad un terzo *screening*. Una volta isolati i cloni puri si è proceduto all'excisione del fagemide dal fago. La libreria è infatti clonata in un fago contenente al suo interno il fagemide *pBK-CMV*. Se si superinfettano i batteri con il fago *ZAP Express* (contenente il cDNA) e con un fago *helper Ex Assist* (fornito dal kit Stratagene), è infatti possibile excidere il fagemide.

A tal fine si sono fatte crescere cellule dei ceppi XL1-Blue MRF' e XL0LR in LB rispettivamente fino ad una OD_{600} di 0,2-0,5 e 0,5-1,0. Le cellule XL1-Blue MRF' sono state dunque sedimentate mediante centrifugazione e risospese in MgSO_4 10 mM fino ad una OD_{600} di 1,0. A 200 µl di queste cellule si sono aggiunti 10 µl delle diluizioni 1:10 e 1:100 dei fagi *ZAP Express* isolati dallo *screening* e 1 µl del fago *helper Ex Assist* ($>1 \times 10^6$ pfu/µl). Le sospensioni così preparate sono state incubate a 37°C per 15 min e successivamente si sono aggiunti 3 ml di LB, lasciando poi ad agitare a 37°C per tutta la

notte in modo da massimizzare l'efficienza della excisione. Le cellule sono state dunque uccise al calore (15 min a 70°C) e, dopo centrifugazione, si è prelevato il sovrantante contenente i fagemidi escissi. Successivamente 200 µl di cellule XL0LR (risospese in MgSO₄ 10 mM fino ad una OD₆₀₀ di 1,0) sono state infettate con due diverse diluizioni di fagemide (100 µl e 10 µl) lasciandole a 37°C per 15 min e, dopo aggiunta di 300 µl di LB, per ulteriori 45 min. Ne è stata dunque piastrata un'aliquota su terreno LB con kanamicina (50 µg/ml). Alcune delle colonie cresciute sono state incubate in 3 ml di terreno LB contenente kanamicina 50 µg/ml e poste a crescere per una notte alla temperatura di 37 °C in agitazione. Il DNA plasmidico estratto (paragrafo 3.2.10) è stato controllato mediante restrizione enzimatica (paragrafo 3.2.11) e sequenziamento (paragrafo 3.2.20).

3.2.9 Trasformazione batterica (*Escherichia coli*) mediante elettroporazione

I costrutti ottenuti nelle varie fasi dei clonaggi (paragrafo 3.2.12) sono stati introdotti in cellule di *E.coli* (ceppi DH10B e DB3.1) mediante elettroporazione. Brevemente a 50 µl di batteri sono stati aggiunti 100 ng di DNA plasmidico o 2 µL delle miscele di ligazione e la sospensione batterica è stata sottoposta ad una scarica elettrica di 1500 V (elettroporatore "Invitrogen Electroporator II", capacitanza 50 µF e *load resistance* pari a 150 V). Immediatamente i batteri sono stati introdotti in 950 µL di brodo SOC, mantenuti a 37°C per 45 minuti ed infine piastrati su terreno LB + agar con gli antibiotici appropriati a seconda del plasmide in uso. Le piastre sono state incubate a 37°C per 12 ore al fine di selezionare i trasformanti.

3.2.10 Preparazione di DNA plasmidico

Per estrarre il DNA plasmidico da cloni batterici è stato utilizzato il metodo della lisi alcalina applicato a preparazioni plasmidiche in piccola scala (*mini-prep*) per piccoli volumi di coltura (3-5 ml). Il metodo prevede di precipitare i batteri mediante centrifugazione per 2 minuti a 16000 x g e successivamente di trattarli sequenzialmente con tre differenti soluzioni:

- 200 µL di soluzione di risospensione P1 (RNAsi A 100 µg/mL, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8);
- 200 µL di soluzione di lisi P2 (NaOH 0,2 M, SDS1% (p/v), pH 8);
- 200 µL di soluzione di neutralizzazione P3 (potassio acetato 3 M, pH 5,5) fredda.

La sospensione ottenuta è stata centrifugata alla massima velocità per 5 minuti a 4°C, al fine di precipitare le impurezze.

In seguito la soluzione contenente il DNA plasmidico recuperata è stata sottoposta a purificazione con fenolo - cloroformio per eliminare eventuali contaminanti proteici. Si è aggiunto quindi alla fase acquosa recuperata un ugual volume di una miscela di fenolo e cloroformio - alcool isoamilico 25:24:1 (v/v/v). Il sovrantante ottenuto da questa prima estrazione è stato poi nuovamente estratto con un ugual volume di cloroformio - alcool isoamilico 24:1 (v:v). Infine il DNA contenuto nella fase acquosa è stato precipitato con 2,5 volumi di etanolo assoluto, recuperato mediante centrifugazione a 16.000 x g a 4°C per 15 minuti, lavato con etanolo 70% (v/v) e infine risospeso in H₂O mQ.

3.2.11 Restrizioni enzimatiche

In questo lavoro sperimentale, le diverse reazioni di restrizione del DNA sono state condotte utilizzando gli enzimi appropriati negli specifici tamponi di reazione (New England Biolabs). Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima per il tempo richiesto, a seconda del tipo di enzima e della quantità di DNA da digerire. Al termine della reazione un'aliquota è stata sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio 1% il quale è stato successivamente colorato con bromuro d'etidio (0,5 µg/ml). Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone TAE 1X.

3.2.12 Tecniche di clonaggio

3.2.12.1 Allestimento dei vettori per gli esperimenti di *RNA interference*

Per effettuare gli esperimenti di silenziamento transiente (paragrafo 3.2.14) mediante *RNA interference* dei geni *FaSHP* e *FaCHS* sono stati allestiti dei vettori binari in grado di mediare l'espressione in *planta* di molecole di RNA a doppio filamento mirate a interferire con la trascrizione dei geni di interesse. Per procedere in tal senso si è deciso di ricorrere all'impiego del plasmide pKANNIBAL (gentilmente fornito da CSIRO, Australia) il quale permette il clonaggio di frammenti di PCR in una cassetta di espressione a forcina (hpRNAi) inserita a valle del promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore (figura 3.3). Questo vettore acconsente di clonare il frammento scelto del gene di interesse in orientamento invertito ai lati di un introne (*PDK intron*) il quale, in qualità di spaziatore, ha lo scopo di aumentare la stabilità del plasmide nelle cellule di *E. coli*, e parallelamente è stato dimostrato aumentare la frequenza di silenziamento (Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001).

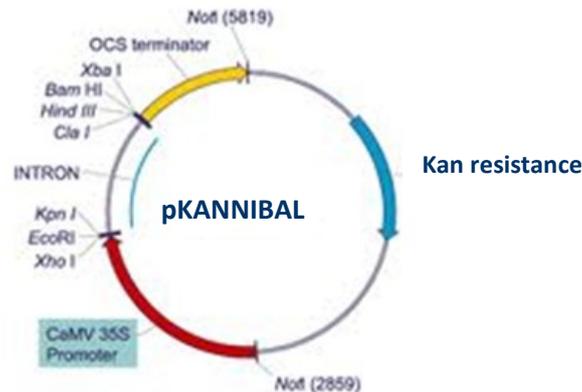


Figura 3.3: Mappa del plasmide pKANNIBAL, modificato da <http://emuch.net/html/201005/2059065.html&docid>.

In prima analisi è stata scelta la porzione delle sequenze da utilizzare per indurre in modo specifico il silenziamento dei geni in analisi. Per quanto riguarda *FaSHP* si è presa in considerazione una regione di 350 nucleotidi (nucleotidi 691-1041 della sequenza isolata in seguito allo *screening* della libreria di cDNA di frutto rosso) corrispondente ad una porzione del dominio C terminale e della regione 3' UTR, dal momento che queste corrispondono alle parti meno conservate del gene e vi è pertanto una minore possibilità di silenziamento aspecifico di altri geni. Relativamente a *FaCHS* è stata scelta una sequenza di 355 nucleotidi (nucleotidi 719-1074 della sequenza AI795154) che corrisponde invece alla regione già impiegata per silenziare lo stesso gene nel lavoro di Hoffmann *et al.* (2006). Successivamente sono stati disegnati gli oligonucleotidi (tabella 3.1) per amplificare le regioni sopradescritte, aggiungendovi alle estremità 5' i siti di restrizione (gli oligonucleotidi senso ed anti-senso contengono rispettivamente i siti di restrizione XbaI-EcoRI e HindIII-KpnI) per permettere di inserire il frammento in orientamento senso ed antisenso ai lati dell'introne nel plasmide pKANNIBAL (figura 3.5).

I frammenti di *FaSHP* e *FaCHS* scelti sono stati amplificati mediante PCR e purificati come descritto nei paragrafi 3.2.6 e 3.2.7. Successivamente tali frammenti sono stati inseriti nel vettore di clonaggio *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega) che presenta due T sporgenti nella regione del sito di policlونaggio, in questo plasmide quest'ultima regione è inserita nel gene reporter Lac-Z, permettendo così di discriminare quando il vettore è vuoto da quando è presente l'inserito, (figura 3.4).

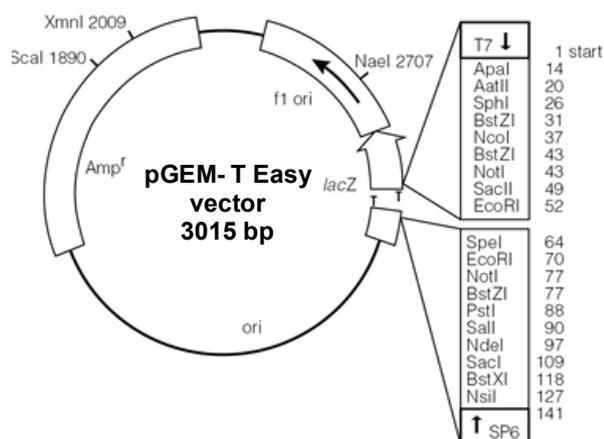


Figura 3.4: Mappa del plasmide pGEM®-T Easy Vector System I, modificato da <http://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/>.

La reazione di ligazione è stata allestita in un volume di 10 μ L utilizzando 3 unità di Weiss di DNA ligasi del batteriofago T4 (Promega), tampone di ligasi (secondo le indicazioni del produttore), 50 ng di plasmide ed inserto, ottenuto come sopra descritto, in quantità tali che il rapporto molare tra il vettore ed il plasmide fosse di 1:3. La reazione è stata condotta alla temperatura di 4°C per una notte. I prodotti della ligazione sono stati poi impiegati per la trasformazione di *E.coli* ceppo DH10B (paragrafo 3.2.9). Alcune colonie resistenti all'ampicillina sono state incubate in 3 ml di terreno LB contenente ampicillina 100 μ g/ml e fatte crescere per una notte alla temperatura di 37 °C in agitazione. Il DNA plasmidico estratto (paragrafo 3.2.10) è stato controllato mediante restrizione enzimatica (paragrafo 3.2.11) e sequenziamento (paragrafo 3.2.20).

In seguito il DNA plasmidico dei due cloni selezionati (pGEM_FaSHPi e pGEM_FaCHSi) è stato sottoposto a due doppie restrizioni con le coppie di enzimi EcoRI-KpnI e XbaI-HindIII, per generare rispettivamente il filamento senso ed antisenso della forcina hpRNAi. Il filamento senso della forcina è stato dunque inserito mediante ligazione nel plasmide pKANNIBAL opportunamente linearizzato con gli enzimi EcoRI e KpnI. Successivamente il filamento antisenso della forcina è stato introdotto nel plasmide ottenuto nella precedente fase di clonaggio, linearizzato in questo caso con gli enzimi XbaI e HindIII.

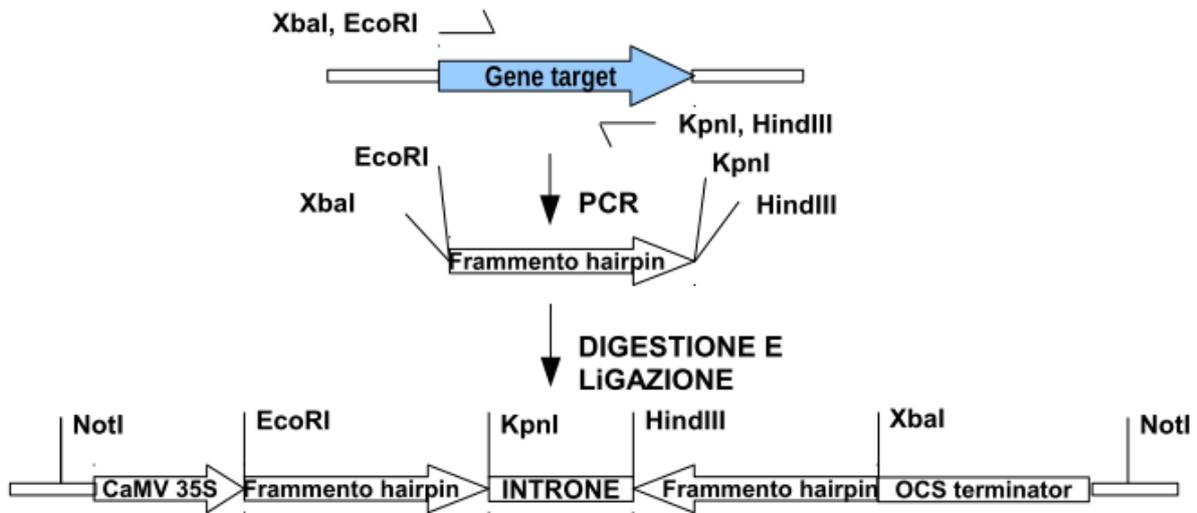


Figura 3.5: Strategia adottata per il clonaggio nel plasmide pKANNIBAL.

Una volta ottenuti i plasmidi contenenti le forcine per il silenziamento dei geni di interesse (pKANNIBAL_FaSHPi e pKANNIBAL_FaCHSi) si è proceduto a trasferire queste ultime nel sito di policlonaggio del vettore di espressione binario pBINplus, il quale porta la resistenza alla kanamicina sia per i batteri che per i sistemi vegetali ed il sito di policlonaggio inserito nel gene lacZ (figura 3.6). Parallelamente è stata trasferita in quest'ultimo vettore anche la cassetta di espressione a forcina vuota per generare un costrutto da impiegare come controllo negativo negli esperimenti di agroinfiltrazione (paragrafo 3.2.14).

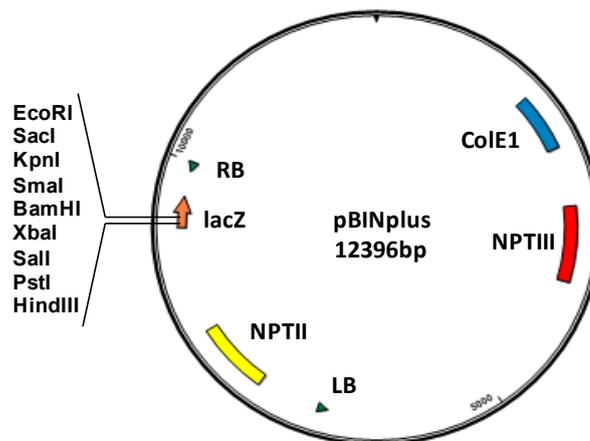


Figura 3.6: Mappa del plasmide pBINplus.

A tal fine il plasmide pBINplus è stato linearizzato mediante digestione con l'enzima SmaI e successivamente trattato con l'enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*), per evitare nella successiva fase di ligazione la reazione intramolecolare di circolarizzazione del vettore. La reazione di defosforilazione è stata allestita in una miscela del volume di 10 µl contenente 500 ng del vettore, *buffer* di reazione (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM) 1 U di enzima, e condotta in un termociclatore "Eppendorf Mastercycler S" secondo il seguente ciclo:

- 1 ora a 37°C ;
- 20 minuti a 65°C.

I vettori pKANNIBAL, pKANNIBAL_FaSHPi e pKANNIBAL_FaCHSi sono stati invece digeriti con l'enzima NotI e sottoposti ad una reazione di *fill-in* con il frammento Klenow della DNA polimerasi I, per rendere piatte le estremità generate dal taglio con NotI. E' stata dunque allestita una miscela in un volume finale di 30 µl contenente 500 ng dell'inserto, *buffer* di reazione (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, ditiotretolo 1 mM), dNTPs 33 µM e 2.5 U dell'enzima (New England Biolabs). La reazione è stata effettuata in un termociclatore "Eppendorf Mastercycler S" secondo il seguente ciclo:

- 15 minuti a 25°C ;
- 20 minuti a 70°C.

La ligazione delle cassette di espressione a forcina nel vettore pBINplus ha portato all'ottenimento dei costrutti finali pBINplus_FaSHPi, pBINplus_FaCHSi e pBINplus_intron.

In questa fase del clonaggio, così come in quelle intermedie sopra-descritte, sono state applicate le stesse condizioni di ligazione descritte per il clonaggio nel plasmide pGEM®-T Easy. In questi casi la selezione dei batteri trasformati è stata condotta su terreno LB selettivo con kanamicina 50 µg/ml. La presenza degli inserti è stata verificata mediante PCR (paragrafo 3.2.6) e restrizioni di controllo (paragrafo 3.2.11).

3.2.12.2 Allestimento dei vettori per gli esperimenti di sovra-espressione

Per effettuare gli esperimenti di sovra-espressione transiente del gene *FaSHP* in frutti di fragola (paragrafo 3.2.14) il cDNA del gene è stato clonato nel vettore di espressione binario pBINAr_GWa. Questo vettore porta la resistenza alla kanamicina sia per i batteri che per i sistemi vegetali, presenta il sito di policlونaggio a valle del promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore in grado di mediare l'espressione costitutiva in pianta; esso contiene inoltre la cassetta Gateway clonata nel sito di restrizione SmaI del polilinker, permettendo così di clonare le sequenze di interesse sfruttando la tecnologia Gateway (figura 3.7). Lo stesso vettore è stato impiegato anche per allestire i costrutti per la trasformazione delle piante di pomodoro (paragrafo 3.2.15). In quest'ultimo caso il cDNA

del gene *TM8* ed il cDNA di *TM8* fuso *in frame* con una breve sequenza codificante il peptide SRDX (Hiratsu *et al.*, 2003) sono stati clonati nel plasmide in questione rispettivamente per la sovra-espressione permanente del gene e per la sovra-espressione permanente dello stesso in forma di repressore trascrizionale.

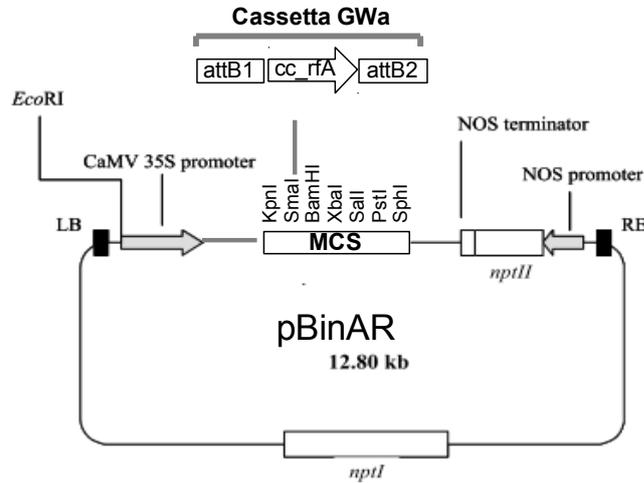


Figura 3.7: Mappa del plasmide pBinAR_GWa.

I cDNA di *FaSHP*, *TM8* e della chimera *TM8::SRDX* sono stati amplificati mediante PCR (paragrafo 3.2.6) impiegando gli oligonucleotidi sequenza specifici riportati in tabella 3.1, nel caso della chimera è stato utilizzato un oligonucleotide rev contenente il dominio SRDX. I prodotti di PCR sono stati purificati come descritto nel paragrafo 3.2.7 e successivamente inseriti nel plasmide pCR8-TOPO vector usando il kit commerciale *pCRTM8/GW/TOPO[®]TA Cloning[®]* (Invitrogen). Questo kit sfrutta l'attività terminal-transferasica della Taq polimerasi che determina l'aggiunta di una singola deossadenina (A) all'estremità 3' dei prodotti di PCR. Il vettore linearizzato fornito dal kit possiede una singola deossitimidina (T) che protrude all'estremità 3' permettendo così l'efficiente inserimento del prodotto di PCR nel plasmide. La reazione di ligazione avviene ad opera dell'enzima Topoisomerasi del Virus *Vaccinia* fornito dal kit legato alle estremità 3' del vettore linearizzato (figura 3.8).

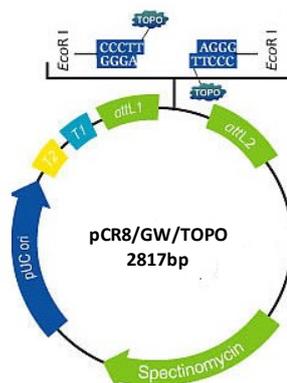


Figura 3.8: Mappa del plasmide pCRTM8/GW/TOPO[®], modificato da <http://www.products.invitrogen.com/ivgn/product/K250020>.

Seguendo le istruzioni del produttore, la reazione è stata allestita in una miscela del volume di 5 μ l contenente 4 μ l dei prodotti di PCR purificati, 1 μ l del *buffer Salt Solution* e 1 μ l del vettore linearizzato. La miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 5 minuti e successivamente 2 μ l sono stati utilizzati per elettroporare cellule di *E.coli* (ceppo DH10B). La selezione dei batteri trasformati (contenenti i plasmidi pCR8-TOPO_FaSHP, pCR8-TOPO_TM8 e pCR8-TOPO_TM8SRDX) è stata condotta su terreno LB + agar con spectinomycin 50 μ g/ml. La presenza degli inserti è stata verificata mediante PCR (paragrafo 3.2.6) e successivo sequenziamento (paragrafo 3.2.20).

L'inserimento dei cDNA di interesse nel vettore pBINAr_GW è stato effettuato impiegando la tecnologia Gateway. Trattasi di un metodo di clonaggio universale basato sulle proprietà di ricombinazione sito-specifiche del batteriofago λ . Tale ricombinazione è catalizzata da un mix di enzimi che si legano a sequenze specifiche (siti *att*, abbreviazione di *attachment sites*), portano vicine le sequenze target, le tagliano e legano covalentemente il DNA. I frammenti di DNA da trasferire sono fiancheggiati da sequenze *att* modificate, sulle quali agisce il mix di enzimi (integrasi fagica ed altri fattori di integrazione dell'ospite). Vi sono due reazioni di ricombinazione che rappresentano la base della tecnologia Gateway: *attB attP* ("BP clonase") and *attL attR* ("LR clonase", Hartley *et al.*, 2000) (figura 3.9).

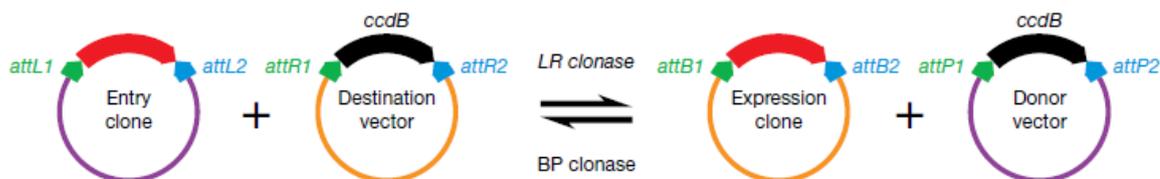


Figura 3.9: Figura schematica delle ricombinazioni possibili con il sistema Gateway, modificato da <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/products-and-services/applications/clonino/Gateway-cloning/clonase-enzyme.html>.

Dal momento che nel plasmide pCR®8/GW/TOPO® l'inserto è fiancheggiato dai siti *attL*, lo si può utilizzare in una reazione di "LR-Clonase" con un vettore di destinazione caratterizzato dalla presenza dei siti *attR*, esattamente quelli presenti nella cassetta Gateway del vettore pBINAr_GW_a.

Secondo le istruzioni del produttore è stata allestita una miscela di reazione in un volume finale di 10 µl contenente 100 ng di uno dei plasmidi pCR8-TOPO_FaSHP, pCR8-TOPO_TM8 e pCR8-TOPO_TM8SRDX, 100 ng del vettore pBINAr_GW, *buffer* TE e 2 µl del mix di enzimi LR Clonase II. La miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo aver bloccato la reazione mediante aggiunta di 1 µl della soluzione Proteinasi K e successiva incubazione a 37°C per 10 minuti, 2 µl di questa miscela sono stati impiegati per elettroporare cellule di *E.coli* del ceppo DB3.1 resistente al gene *ccdB*. Le cellule trasformate sono state selezionate sia mediante selezione positiva con l'antibiotico kanamicina, sia mediante selezione negativa. Il gene *ccdB* viene infatti mantenuto nei vettori non ricombinanti e porta a morte delle cellule del ceppo DH10B. Il DNA dei vettori finali pBINAr_FaSHP, pBINAr_TM8 e pBINAr_TM8::SRDX è stato estratto mediante *mini-prep* (paragrafo 3.2.10) dalle colonie trasformate, controllato mediante PCR (paragrafo 3.2.6) e restrizioni di controllo (paragrafo 3.2.11) e successivamente impiegato per la trasformazione di *A. tumefaciens* (paragrafo 3.2.13).

3.2.12.3 Clonaggio del promotore del gene *FaSHP*

Per clonare il promotore del gene *FaSHP* si è pensato di avvalersi del genoma di *Fragaria vesca* che è stato recentemente pubblicato (Shulaev *et al.*, 2011). Al fine di isolare il gene di *F.vesca* ortologo di *FaSHP*, il cDNA di *FaSHP* è stato allineato sul genoma utilizzando il programma BLASTN. Una volta identificato il gene *FvSHP* che presenta nella regione codificante il 98% di identità nucleotidica con *FaSHP* (gene 24494), sono stati disegnati degli oligonucleotidi specifici sulla regione promotoriale. E' stata dunque condotta una PCR (paragrafo 3.2.6) su DNA genomico estratto da foglia di *F. x ananassa* e l'amplificato di 1600 bp prodotto dalla coppia di oligonucleotidi innesco riportati in tabella 3.1 è stato opportunamente purificato (paragrafo 3.2.7) e clonato nel vettore di clonaggio *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega) (figura 3.4). Tre cloni indipendenti sono stati sequenziali e la sequenza ottenuta è stata analizzata con programmi dedicati come descritto al paragrafo 3.2.20.

3.2.13 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*

Per la trasformazione delle piante di pomodoro si è fatto uso del ceppo LBA4404 di *A.tumefaciens*, mentre per gli esperimenti di espressione transiente in frutti di fragola è stato impiegato il ceppo AGL0, il quale presenta una maggiore virulenza e risulta pertanto essere più appropriato per questo secondo tipo di metodica.

La trasformazione batterica è stata effettuata incubando 1 ml di cellule di *A.tumefaciens* con 0,5-1,0 µg di DNA plasmidico (vettori binari preparati come descritto nei paragrafi 3.2.12). Successivamente la sospensione batterica è stata sottoposta a *shock* termico mediante incubazione per 5 minuti in ghiaccio, 5 minuti in azoto liquido ed infine 5 minuti a 37° C. Dopo diluizione in 1 ml di terreno YEB le cellule sono state messe in agitazione per 4 ore a temperatura ambiente e piastrate su terreno solido YEB contenente gli appropriati antibiotici. Nel caso dei vettori pBINplus_FaSHPi, pBINplus_FaCHSi, pBINplus_introne e pBINAr_FaSHP inseriti nel ceppo AGL0 si è fatto uso di kanamicina 50 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml. Nel caso invece dei vettori pBINAr_TM8 e pBINAr_TM8::SRDX sono stati impiegati kanamicina 50 µg/ml e streptomicina 100 µg/ml. Le colonie delle cellule sviluppatesi sono state controllate mediante PCR (paragrafo 3.2.6) e di digestione del DNA (paragrafo 3.2.11).

3.2.14 Trasformazione transiente di frutti di fragola mediante agroinfiltrazione

Gli esperimenti di espressione transiente in frutti di fragola sono stati effettuati secondo quanto descritto nel lavoro di Hoffmann *et al.* (2006). Brevemente, colture di agrobatteri del ceppo AGL0 opportunamente ingegnerizzati con i costrutti pBINplus_FaSHPi, pBINplus_FaCHSi, pBINplus_introne e pBINAr_FaSHP sono state fatte crescere a 28 °C in terreno YEB tamponato a pH 5.6 con MES (2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid) 10 mM, al quale sono stati aggiunti kanamicina 50 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml. Al raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ paria a circa 0.8 gli agro batteri sono stati precipitati, risospesi in 0.2 volumi di terreno MMA ed incubati a 22°C per circa 1 ora.

Le sospensioni di agrobatteri così ottenute sono state iniettate per mezzo di una siringa sterile ipodermica da 1 ml in frutti verdi allo stadio di sviluppo verde grande 2 (15 giorni dopo l'antesi) attaccati alla pianta. Si è cercato di distribuire la sospensione batterica in modo omogeneo nei frutti senza superare le 4 iniezioni per frutto. La superficie dei frutti è stata in seguito asciugata per eliminare l'eccesso di agrobatteri. I frutti sono stati raccolti al raggiungimento degli stadi rosa e rosso dopo l'agroinfiltrazione (dopo un massimo di 14 giorni dal trattamento) secondo quanto descritto nel paragrafo 4.1.3. I frutti sono stati macinati in azoto liquido e conservati a -80°C per le successive analisi.

3.2.15 Trasformazione delle piante di pomodoro

Semi di pomodoro appartenenti alla cultivar *Florida Petite* sono stati sterilizzati mediante agitazione per 20 minuti in una soluzione contenente ipoclorito di sodio 5% (v/v) e Tween 20 0,1% (v/v), sono stati poi lavati sempre mediante agitazione in acqua sterile mediante tre successivi cicli di 10 minuti ciascuno. I semi sterilizzati sono stati quindi seminati su terreno 1/2 MS in magenta (100 semi per contenitore) e posti a 4°C per una notte. Successivamente sono stati fatti germinare alla temperatura di 25 °C in presenza di un fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 ore di buio. Dopo circa 10 giorni si sono prelevati i cotiledoni praticandovi dei tagli alle estremità e nel mezzo e gli stessi sono stati trasferiti in terreno T210 + acetosiringone 200 µM con la pagina superiore rivolta verso l'alto. I cotiledoni sono rimasti in questo terreno di condizionamento per 36 ore alla stessa temperatura e con il medesimo fotoperiodo sopra-citati.

Una coltura di *A. tumefaciens* (ceppo LBA4404 portante il plasmide opportuno) è stata fatta crescere per una notte a 28°C in terreno YEB. Il giorno successivo questo inoculo *starter* è stato utilizzato per preparare una sospensione batterica (terreno YEB + acetosiringone 20 µM) avente OD₆₀₀ pari a 0.02 che è stata posta a crescere per una notte a 28° C. Al raggiungimento di un valore di OD₆₀₀ paria a circa 0.8 gli agrobatteri sono stati precipitati e risospesi in 0,2 volumi di terreno OMS. La soluzione batterica è stata dunque diluita 1:30 in OMS + acetosiringone 20 µM ed utilizzata per infettare i cotiledoni tenendoli in immersione per 5 minuti. Questi ultimi sono stati successivamente asciugati su carta sterile e ri-trasferiti nel terreno di condizionamento (T210 + acetosiringone 200 µM), dove sono rimasti a co-coltivare con gli agrobatteri al buio a 25°C per 36 ore. I cotiledoni sono stati poi spostati nel terreno di selezione T210 + kanamicina 30 mg/l + cefotaxime 500 mg/l e mantenuti in fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio a 25°C. In tali condizioni, dopo circa 40 giorni si sono formati dei calli. Questi sono stati trasferiti in terreno T21 + kanamicina 50 mg/l + cefotaxime 250 mg/l (mezzo di allungamento) al fine di permettere lo sviluppo di germogli ed il loro allungamento. I germogli originatisi sono stati pertanto fatti radicare in terreno 1/2 MS + kanamicina 300 mg/l + cefotaxime 250 mg/l. Dopo lo sviluppo delle radici le piante sono state trasferite in terra.

3.2.16 Trattamenti ormonali

Per i trattamenti ormonali dei frutti di fragola sono stati utilizzati frutti, staccati dalle piante, allo stadio di sviluppo bianco 2 (W2). Brevemente tre gruppi di 60 frutti sono stati disposti separatamente in contenitori di plastica in modo tale che solo i sepali fossero a contatto con il supporto. Il gruppo A è stato spruzzato con una soluzione contenente l'auxina sintetica NAA (acido naftalenacetico, Sigma-Aldrich) 2 mM, Tween 20 0.5% (v/v). Il gruppo B è

stato spruzzato invece con acido abscissico (*cis*, *trans*-ABA, Sigma-Aldrich) 100µM, Tween 20 0.5% (v/v) ed infine il gruppo C di controllo è stato spruzzato solo con Tween 20 0.5% (v/v). 10 frutti per ciascun gruppo sono stati campionati dopo 2, 4, 6, 12, 18 ore dall'inizio del trattamento, sono stati dunque tagliati e macinati in azoto liquido ed infine conservati a -80°C per le successive analisi. Nell'arco dell'esperimento i frutti sono stati spruzzati più volte, esattamente ogni 30 minuti per le prime 4 ore e successivamente ogni 2 ore fino al campionamento delle 12 ore. I frutti sono stati mantenuti per tutta la durata dell'esperimento in una camera climatizzata alla temperatura di 22°C.

3.2.17 Microscopia ESEM

Le analisi al microscopio ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*), modello XL30 Philips, sono state eseguite presso il Centro Universitario Grandi Apparecchiature Scientifiche (CUGAS) dell'Università degli Studi di Padova.

Questa apparecchiatura costituisce non solo una naturale evoluzione della microscopia elettronica a scansione sotto il profilo elettronico ed informatico, ma si propone come nuovo approccio concettuale che permette di superare il vincolo imposto dalla necessità di operare in condizioni di vuoto elevato, come nel caso dei microscopi elettronici convenzionali.

Il differente funzionamento si basa sull'esistenza di una colonna che può lavorare in differenti modalità di vuoto: elevato nella zona della colonna vera e propria (zona filamento e zona lenti), minore in prossimità del diaframma finale e decisamente più basso nella camera vera e propria ove viene posto il campione. Attraverso l'impiego di questo strumento è stato possibile eseguire osservazioni su campioni allo stato "naturale", ovvero su materiale biologico idratato.

3.2.18 Test di vitalità del polline

Per determinare la vitalità del polline prodotto dai fiori delle piante di pomodoro transgeniche si è fatto uso di un saggio di tipo colorimetrico come descritto nel lavoro di Wang *et al.*, (2004). Questo test si basa sull'impiego di un sale di tetrazolio [MTT: 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] classicamente impiegato in studi di proliferazione cellulare. Questo composto di colore giallo viene convertito da parte delle deidrogenasi mitocondriali in una sostanza insolubile (MTT formazano) di colore blu, permettendo così di discriminare tra le cellule vive e quelle non vitali. Le antere di 10 fiori prelevati casualmente dalle diverse infiorescenze della pianta di interesse sono state introdotte in 800 µl di una soluzione contenente MTT 1% (p/v), saccarosio 5% (p/v). Dopo aver mescolato vigorosamente la provetta contenente le antere mediante vortex, questa è

stata sottoposta a centrifugazione a 10000 x g per 1 minuto. I granuli pollinici così estratti dalle antere sono stati contati per mezzo di una camera burker al microscopio ottico (LEICA DM5000). Si sono considerati vitali i granuli colorati di color viola - rosa intenso. La percentuale di vitalità del polline è stata calcolata analizzando 1000 granuli per ciascuna pianta in esame. A controllo negativo dell'esperimento le antere di 10 fiori selvatici sono state incubate per 2 ore a 80°C prima di procedere al saggio; è noto infatti che questo tipo di trattamento risulta letale per il polline.

3.2.19 Analisi dei pigmenti clorofilliani

Pezzetti di tessuto (0.5 g) sono stati prelevati da foglie di età confrontabile nelle piante oggetto di studio, posti in mortaio e finemente macinati dopo l'aggiunta di sabbia di quarzo. Si è dunque aggiunto dietilere (1 ml per volta) continuando a macinare e mescolare. La sospensione ottenuta è stata in seguito trasferita in una provetta falcon da 15 ml e si è continuato a mescolare ed aggiungere dietilere fintanto che la sabbia di quarzo non è risultata essere bianca. L'estratto è stato dunque analizzato con uno spettrofotometro "Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 11", eseguendo letture di assorbanza alle seguenti lunghezze d'onda:

662 nm per la clorofilla *a*;

644 nm per la clorofilla *b*.

I valori quantitativi della clorofilla *a* e della clorofilla *b* ($\mu\text{g/g}$ PF, peso fresco) sono stati ottenuti utilizzando i coefficienti di assorbimento proposti da Lichtenthaler *and* Wellburn (1985):

clorofilla *a* = $(10.05 A_{662} - 0.766 A_{644}) \times v/p$

clorofilla *b* = $(16.37 A_{644} - 3.14 A_{662}) \times v/p$

3.2.20 Determinazione delle sequenze di DNA ed analisi dedicate

Le sequenze di DNA sono state ottenute mediante sequenziamento automatico con lo strumento "Abi Prism 377 DNA Sequencer" (PE, Applied Biosystem, USA), eseguito presso il centro BMR Genomics (Padova), secondo quanto riportato nel sito www.bmr-genomics.it. Le sequenze così prodotte sono state analizzate con i programmi del pacchetto Lasergene (DNASTAR Inc., USA).

Per le ricerche di similarità con i programmi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) sono stati utilizzati i programmi standard disponibili presso il server del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Per le analisi dei promotori sono stati utilizzati i seguenti software: PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>), PLACE (<http://www.dna.affrc>).

go.jp/PLACE), TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) e MatInspector (<http://www.genomatix.de/solutions/genomatix-software-suite.html>).

3.2.21 Analisi filogenetica

Le analisi filogenetiche sono state condotte considerando sequenze di fattori di trascrizione MADS-box identificate nel database Genbank. Le sequenze sono state allineate usando il programma ClustalW prendendo in considerazione per ognuna i domini M, I, K (circa i primi 150 amminoacidi). Gli allineamenti, così prodotti, sono stati ottimizzati usando il programma Gblocks presente nel sito www.phylogeny.fr. In seguito gli allineamenti sono stati utilizzati per la costruzione degli alberi filogenetici secondo l'algoritmo Neighbor Joining (Saitou *et al.*, 1987), presente nel pacchetto bioinformatico MEGA 4.0.2. I valori di *bootstrap* riportati negli alberi sono il risultato di 1000 repliche di *bootstrap*. Nella tabella 3.3 sono riportate le sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica.

| NOME SEQUENZA | Numero di accesso (Genbank) |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Rosa rugosa</i> MASAKOD1 | BAA90743.1 |
| <i>Malus x domestica</i> MADS14 | HMI225981 |
| <i>Prunus persica</i> PpPLE | ACL31234.1 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SHP1 | NP_191437.1 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SHP2 | AAU82079 |
| <i>Antirrhinium majus</i> AmPLE | AAB25101 |
| <i>Petunia hybrida</i> FBP6 | JN654512.1 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> TAGL1 | NP001234187 |
| <i>Rosa rugosa</i> MASAKOC1 | AB025644.1 |
| <i>Malus x domestica</i> MADS15 | CAC80858 |
| <i>Fragaria x ananassa</i> STAG1 | AAD45814 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> AG | NP_567569 |
| <i>Antirrhinium majus</i> AmFAR | CAB42988 |
| <i>Petunia hybrida</i> PMADS3 | X72912 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> TAG1 | AAM33099 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SEP1 | AAA32732 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SEP2 | AAA32734 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SEP3 | AAB67832 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> SEP4 | NM_201682 |
| <i>Fragaria x ananassa</i> FaMads9 | AF484683 |

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| <i>Solanum lycopersicum</i> RIN | AAM1577 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> AP3 | NM_115294.5 |
| <i>Cryptomeria japonica</i> M09 TM8 | AB359027 |
| <i>Cryptomeria japonica</i> 023 TM8 | AB359028 |
| <i>Taxus baccata</i> TM8 | JF519756.1 |
| <i>Ginkgo biloba</i> GbMADS6 | AB029468 |
| <i>Ginkgo biloba</i> GbMADS7 | AB029469 |
| <i>Ginkgo biloba</i> GbMADS11 | AB029473 |
| <i>Vitis vinifera</i> VvMADS6 | XM_002283880 |
| <i>Cucumis sativus</i> ERAF17 | AB046596 |
| <i>Populus trichocarpa</i> PtMADS2 | XM_002321675.1 |
| <i>Antirrhinum majus</i> DEFH7 | AJ311828.1 |
| <i>Ginkgo biloba</i> AG | AY114304 |
| <i>Chara globularis</i> CgMADS1 | AB035567 |

Tabella 3.3: Sequenze prese in esame per le analisi filogenetiche con il relativo numero di accesso al database Genebank.

4. Risultati e Discussione

4.1 Analisi funzionale del gene *FaSHP* di *Fragaria x ananassa*

Tra i geni MADS-box per i quali è stato proposto un ruolo di regolazione delle fasi terminali dello sviluppo del frutto, quelli appartenenti alla sottofamiglia *AGAMOUS* sono senza dubbio i più rappresentati. Secondo il modello ABC(D)E (paragrafo 1.1.5) tali geni esplicano l'attività C ed in particolare intervengono nel determinare l'identità dei carpelli; non sorprende dunque il loro successivo reclutamento per la trasformazione degli ovari in frutti. Il fatto che questo sia un ruolo generale è dimostrato dal coinvolgimento di rappresentanti di questo gruppo nella regolazione dello sviluppo sia di frutti secchi, sia di frutti carnosì. Così i geni *SHP1* e *SHP2* di *Arabidopsis thaliana* e *NbSHP* di *Nicotiana benthamiana* controllano lo sviluppo di strutture che determinano la deiscenza dei rispettivi frutti che sono secchi (Liljegren *et al.*, 2000; Fourquin and Ferrandiz, 2012), mentre i geni *TAGL1* di *Solanum lycopersicum* e *PpPLENA* di *Prunus persica* regolano diversi aspetti della sindrome di maturazione e intervengono nel definire il carattere carnosità (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009; Tadiello *et al.*, 2009). Tutte le specie sopra-menzionate producono dei frutti *sensu strictu*, nei quali cioè il frutto si sviluppa dai tessuti dell'ovario. La scoperta che nelle strutture carnose associate ai semi di due Gimnosperme (*Taxus baccata* e *Ginkgo biloba*) sono espressi geni *AGAMOUS-like* ha fatto riflettere su un possibile ruolo più ampio dei geni della sottofamiglia *AGAMOUS* nel regolare la formazione di strutture deputate a facilitare il processo di disseminazione, indipendentemente dalla loro origine anatomica che può essere anche non ovarica. Per indagare in tal senso abbiamo deciso di focalizzare l'attenzione su *Fragaria x ananassa* che, come sottolineato nell'introduzione, produce un falso frutto (paragrafo 1.2.1), con l'idea di verificare se anche in questa specie possa esservi un gene *AGAMOUS-like* coinvolto nei processi in questione.

4.1.1 Identificazione ed analisi della sequenza del gene *FaSHP*

Usando le sequenze dei geni *SHP1*, *SHP2*, *TAGL1* e *PpPLENA* sopra-menzionati sono stati quindi condotti degli allineamenti con il programma BLASTN sulle sequenze di fragola presenti nel database Genbank. Questi ultimi hanno portato all'identificazione di una serie di EST (*expressed sequence tags*) (CO380891, EX686940, EX687722) le quali sono state opportunamente assemblate in una sequenza che è risultata essere un cDNA parziale. Al fine di completare tale cDNA si è deciso di ricorrere all'uso di una libreria di cDNA di frutto rosso presente nel laboratorio in cui ho svolto la mia attività di ricerca e che è già stata impiegata con successo per l'isolamento di altri geni coinvolti nella maturazione del frutto (Trainotti *et al.*, 1999). Lo *screening* di tale libreria è stato effettuato come riportato nella sezione materiali e metodi (paragrafo 3.2.8), usando una sonda di circa 200 nucleotidi disegnata nella regione all'estremità 5' del cDNA parziale dedotto dalle EST (corrispondente al dominio C-terminale del fattore di trascrizione putativo, quindi alla regione meno conservata del frammento a disposizione). Il vaglio della libreria ha portato all'identificazione di un cDNA completo della lunghezza di 1139 nucleotidi. L'analisi della sequenza ha messo in evidenza come tale cDNA sia costituito da una regione 5'UTR di 67 nucleotidi, seguita da una sequenza codificante della lunghezza di 750 nucleotidi al cui termine si trova una regione 3' UTR di 322 nucleotidi. L'ORF codifica per una proteina di 249 amminoacidi. Utilizzando il programma PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) è stato possibile identificare i domini proteici contenuti nella sequenza proteica predetta. In particolare il dominio MADS-box, costituito da 50 amminoacidi, si trova localizzato tra gli amminoacidi 29 e 79, mentre il dominio K, è localizzato più a valle, tra i residui 96 e 192 (figura 4.1.1, allegato 5.1).

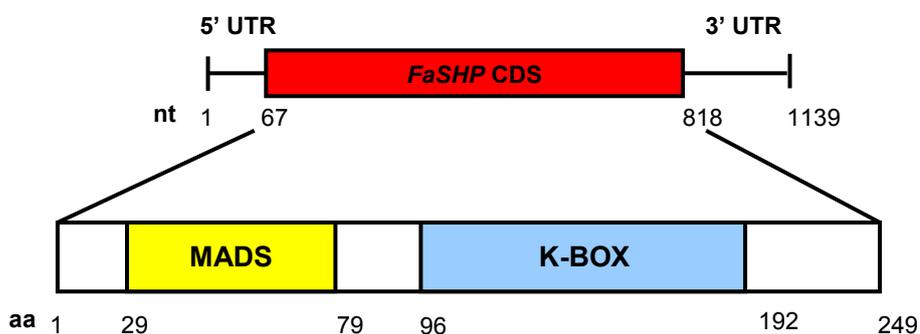


Figura 4.1.1: Schema del cDNA di *FaSHP* e caratteristiche della sequenza proteica predetta.

Conducendo un'indagine nel database Genbank con il programma BLASTX si è osservato come la sequenza proteica predetta presenti la maggiore similarità amminoacidica (96%) con la sequenza Mads Box protein *Rosa rugosa* (MASAKOD1) (BAA90743.1). Riferendosi poi alle sequenze per le quali è stato proposto un ruolo nello sviluppo del frutto si osserva una similarità dell'85% con PpPLENA (ACL31234.1), del 68% con TAGL1 (NP001234187), del 70% con NbSHP (AFK13160) ed infine del 72% e 68% rispettivamente con SHP1 (NP_191437.1) e SHP2 (AAU82079). L'elevata similarità con le sequenze di *Rosa rugosa* e *Prunus persica* sottolinea la vicinanza filogenetica di queste due specie con *Fragaria x ananassa*, tutte e tre le specie appartengono infatti alla famiglia *Rosaceae*.

Le sequenze considerate per questa analisi fanno parte del clade *PLENA* della sottofamiglia *AGAMOUS*. E' noto che molto presto durante la storia evolutiva delle eudicotiledoni si è verificata una duplicazione in questa sottofamiglia che ha dato origine al clade *PLENA* ed al clade *euAGAMOUS* (Kramer *et al.*, 2004). Pertanto tutte le specie di eudicotiledoni note presentano almeno due geni *AGAMOUS-like* appartenenti rispettivamente ai due cladi. Lo studio funzionale di questi geni ha messo in evidenza come l'attività C (paragrafo 1.1.5) sia distribuita tra questi geni in maniera diversificata in specie diverse ad indicare eventi successivi di sub-funzionalizzazione. Sembra, tuttavia, che il ruolo nel regolare le fasi tardive dello sviluppo del frutto sia conservato nei geni del clade *PLENA* (Fourquin *and* Ferrandiz, 2012). Al fine di verificare se anche la sequenza di fragola isolata appartenga al clade *PLENA*, è stato costruito un albero filogenetico prendendo in considerazione le sequenze proteiche dedotte di una serie di geni noti per far parte dei due distinti cladi (paragrafo 3.2.21). L'albero filogenetico ottenuto (figura 4.1.2) mostra chiaramente come la sequenza isolata trovi collocazione nel clade *PLENA*, tra le sequenze delle specie appartenenti alla famiglia *Rosaceae*. Dal momento che in questo clade i primi ad essere stati studiati sono i geni *SHP1* e *SHP2* di *A. thaliana* si è deciso di denominare la sequenza isolata *FaSHP* (ossia, *Fragaria x ananassa SHATTERPROOF-like*), e d'ora in avanti mi riferirò ad essa con questo nome.

Tra le sequenze considerate per la costruzione dell'albero filogenetico vi è anche il gene *STAG1*, un gene *AGAMOUS-like* di fragola isolato in precedenza (Rosin *et al.*, 2003). Dall'analisi filogenetica condotta si può osservare come *STAG1* rimanga completamente distaccato da *FaSHP* e si collochi tra le sequenze del clade *euAGAMOUS*, *FaSHP* e *STAG1* sono dunque due geni *AGAMOUS-like* di fragola appartenenti ciascuno ad uno dei due cladi tipici delle eudicotiledoni.

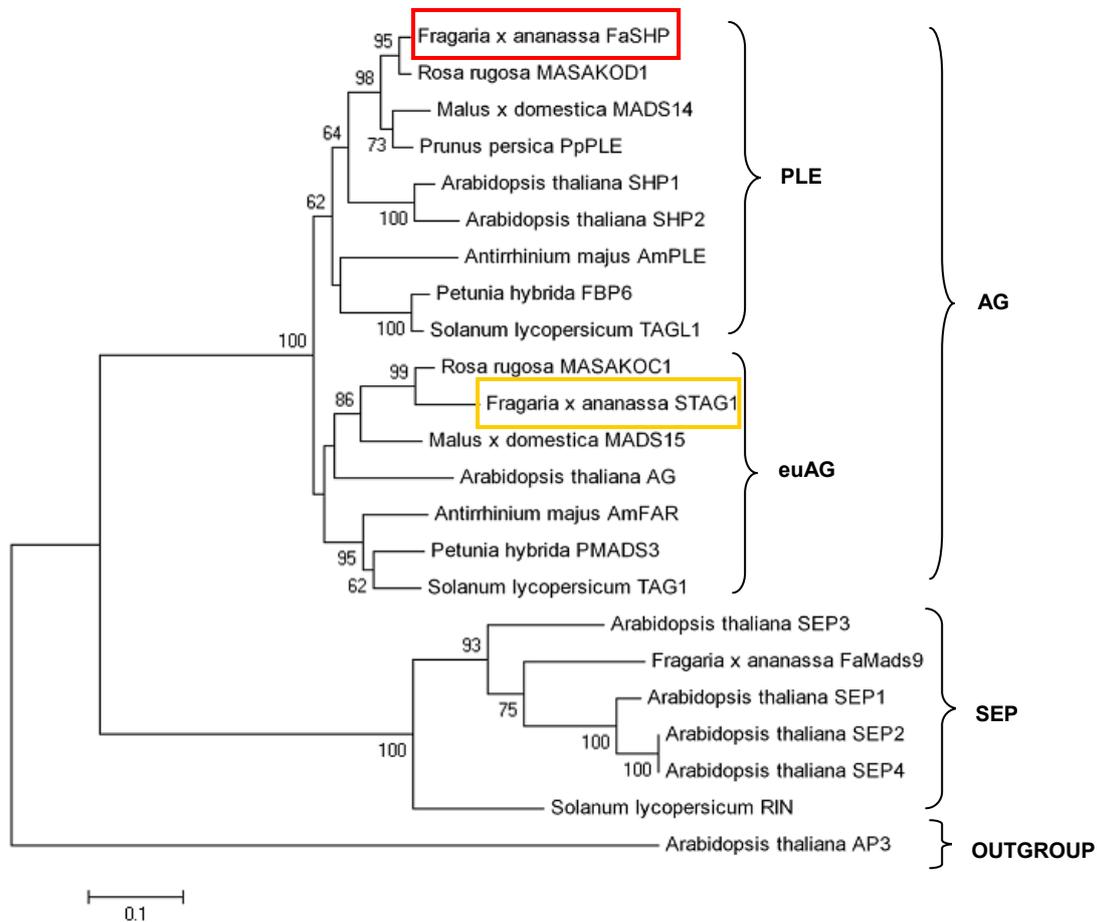


Figura 4.1.2: Albero filogenetico costruito utilizzando alcune sequenze tradotte di geni MADS-box di specie appartenenti alle eudicotiledoni, che mette in evidenza la collocazione di *FaSHP* e *STAG1* rispettivamente nel clade *PLENA* e nel clade *euAGAMOUS* della sottofamiglia *AGAMOUS*.

4.1.2 Analisi di espressione dei geni *AGAMOUS-like* di fragola: *FaSHP* e *STAG1*

L'identificazione di *FaSHP* in una libreria di frutto rosso ne implica l'espressione e suggerisce che tale gene possa svolgere una qualche funzione nelle fasi tardive di sviluppo del frutto. Per avere una prima indicazione relativa al ruolo di *FaSHP* si è deciso di effettuare un'analisi di espressione mediante *real-time* PCR, utilizzando cDNA retrotrascritto da RNA estratto da foglie, fiori all'antesi e frutti a diversi stadi di sviluppo (paragrafi 3.1.2 e 3.2.3). Parallelamente è stato valutato anche il profilo di espressione del gene *STAG1*. Nell'articolo pubblicato da Rosin *et al.* (2003) viene infatti messa in evidenza la presenza dei trascritti di questo gene nel fiore e nel frutto, senza però definirne l'abbondanza relativa nei diversi stadi di sviluppo. Si è reso dunque necessario condurre

un'analisi mediante *real-time* PCR anche per questo gene, per poterne confrontare il profilo con quello di *FaSHP*.

Come si può osservare in figura 4.1.3, nessuno dei due geni viene espresso nella foglia, mentre entrambi sono presenti in fiore e frutto, a conferma del coinvolgimento dei geni *AGAMOUS-like* nello sviluppo riproduttivo della pianta. Il grafico mostra inoltre chiaramente come il livello di espressione di *FaSHP* sia sempre superiore a quello di *STAG1*. Osservando poi i trascritti dei due geni nei vari stadi di sviluppo del frutto si può apprezzare come quelli di *FaSHP* decrescano dallo stadio verde piccolo a quello verde grande 1, per poi riprendere a crescere e raggiungere un massimo nello stadio rosa. Nel caso invece dei trascritti di *STAG1*, dopo il simile decremento dallo stadio verde piccolo a quello verde grande 1, si assiste ad un aumento che si interrompe nello stadio bianco 1, i trascritti tornano infatti poi a decrescere in maniera continuativa fino ad un livello molto basso nei frutti maturi. Il profilo crescente di *FaSHP* durante la maturazione del frutto, la quale ha inizio nella fase di frutto bianco, suggerisce un possibile ruolo di questo gene in questo processo. L'espressione di *STAG1* diminuisce, invece, durante la maturazione e ciò induce a pensare che esso espliciti una funzione nelle prime fasi dello sviluppo, piuttosto che durante la maturazione del frutto.

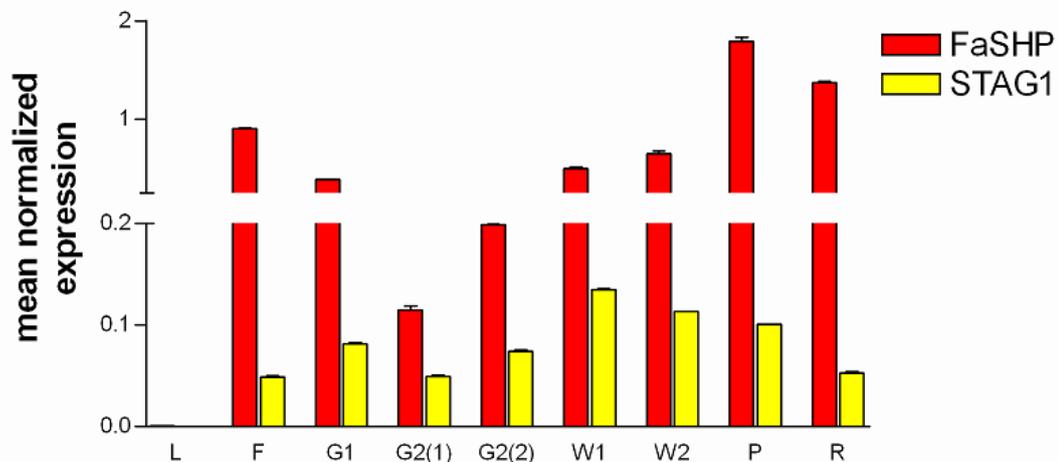


Figura 4.1.3: Profili di espressione di *FaSHP* (rosso) e *STAG1* (giallo) ottenuti mediante esperimenti di *real-time* PCR. L: foglia, F: fiore, G1: frutto verde piccolo, G2(1): frutto verde grande 1, G2(2): frutto verde grande 2, W1: frutto bianco 1, W2: frutto bianco 2, P: frutto rosa, R: frutto rosso. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard (D.S.) delle medie di tre repliche.

4.1.3 Silenziamento e sovra-espressione transiente del gene *FaSHP* in frutti di fragola

Sulla base del profilo di espressione di *FaSHP* si è deciso di condurre un'analisi funzionale utilizzando un approccio di *reverse genetics* per definirne il possibile ruolo durante la maturazione. Questo metodo prevede usualmente di produrre trasformanti stabili caratterizzati da un'aumentata o ridotta espressione del gene di interesse. Poiché non è stato possibile ottenere piante di fragola transgeniche, si è pensato di effettuare degli esperimenti sia di silenziamento (mediante *RNA interference*) che di sovra-espressione transiente del gene nel frutto. A tal fine è stato utilizzato un sistema ideato nel laboratorio in cui ho svolto il lavoro di tesi (Spolaore *et al.*, 2001) e successivamente ottimizzato per i frutti di fragola (Hoffman *et al.*, 2006), il quale è già stato impiegato con successo per la caratterizzazione di una serie di geni implicati nella maturazione del frutto (Schwab *et al.*, 2011). Il metodo prevede di infiltrare, per mezzo di una siringa ipodermica, frutti attaccati alla pianta con una sospensione di agrobatteri, opportunamente ingegnerizzati per modificare l'espressione del gene di interesse.

Dal momento che l'espressione di *FaSHP* nei frutti comincia ad aumentare nello stadio bianco¹, si è pensato di effettuare le infiltrazioni sia per gli esperimenti di silenziamento che per quelli di sovra-espressione nella fase appena precedente, quella di frutto verde grande (15 giorni dopo l'antesi fiorale), in modo tale da poter poi seguire gli effetti dell'aumento o della diminuzione di espressione del gene durante la maturazione del frutto. I vettori di espressione binari per l'ingegnerizzazione degli agrobatteri sono stati allestiti secondo quanto riportato nella sezione materiali e metodi (paragrafi 3.2.12.1 e 3.2.12.2). Brevemente, per la sovra-espressione la regione codificante del gene *FaSHP* è stata posta sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV 35S (costrutto pBINAr_*FaSHP*) mentre, per il silenziamento, una porzione del cDNA di *FaSHP* (compresa tra i nucleotidi 691 e 1041) è stata clonata in orientamento senso ed antisense ai lati di un introne sempre sotto il controllo del promotore CaMV 35S (costrutto pBINplus_*FaSHPi*). Per il silenziamento si è deciso di utilizzare una regione corrispondente a parte del dominio C-terminale e del 3'UTR perché tali regioni sono le meno conservate del gene e vi è dunque una minor probabilità di ottenere una modifica aspecifica nell'espressione di geni correlati. Accanto a questi due costrutti sono stati allestiti anche due vettori da utilizzare come controlli negativo e positivo delle agroinfiltrazioni. Il primo è stato preparato per verificare che eventuali alterazioni della maturazione non siano da attribuire all'infiltrazione stessa degli agrobatteri ed in esso il solo introne è stato posto a valle del promotore CaMV 35S (costrutto pBINplus_intron). Il secondo, volto a ridurre l'espressione del gene codificante l'enzima calcione sintasi (*FaCHS*), è stato allestito in modo simile a quello per il silenziamento di *FaSHP* (costrutto pBINplus_*FaCHSi*), utilizzando in questo caso la stessa porzione del cDNA utilizzata per il silenziamento di questo gene nel lavoro di Hoffmann *et*

al. (2006). A controllo positivo degli esperimenti si è scelto di condurre l'*RNA interference* di un gene che codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi dei pigmenti del frutto perché, come già pubblicato (Lunkenbein *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2006), il suo silenziamento interferisce con la formazione del colore nel frutto, permettendo così di monitorare visivamente il funzionamento del metodo.

Dopo aver introdotto i costrutti preparati in un opportuno ceppo di agrobatteri, sono stati effettuati sei esperimenti di agroinfiltrazione indipendenti sia per il silenziamento che per la sovra-espressione, nel corso di ognuno dei quali sono stati infiltrati almeno 12 frutti con le rispettive sospensioni batteriche. In ognuno dei sei esperimenti, sono stati infiltrati almeno cinque frutti con il costrutto per il controllo negativo e sette frutti con il costrutto per il silenziamento del gene *FaCHS*.

In accordo con quanto pubblicato dal gruppo del Prof. Schwab (Hoffmann *et al.*, 2006), dai 10 ai 12 giorni dopo l'agroinfiltrazione i frutti trattati con il costrutto di controllo acquisiscono la tipica colorazione rossa, i frutti trattati con il costrutto per il silenziamento del gene *FaCHS*, invece, sviluppano una colorazione non omogenea, caratterizzata da regioni bianche oppure rosa chiaro, segno di un'alterazione nell'accumulo dei pigmenti (figura 4.1.4 A). Per confermare il silenziamento del gene a livello molecolare, è stata valutata la sua espressione mediante *real-time* PCR in quattro frutti caratterizzati da una colorazione particolarmente alterata; come si può osservare in figura 4.1.4 B i dati ottenuti confermano che l'espressione del gene è ridotta. Questi dati confermano l'efficienza del sistema di espressione transiente e la funzionalità del costrutto allestito per il silenziamento del gene.

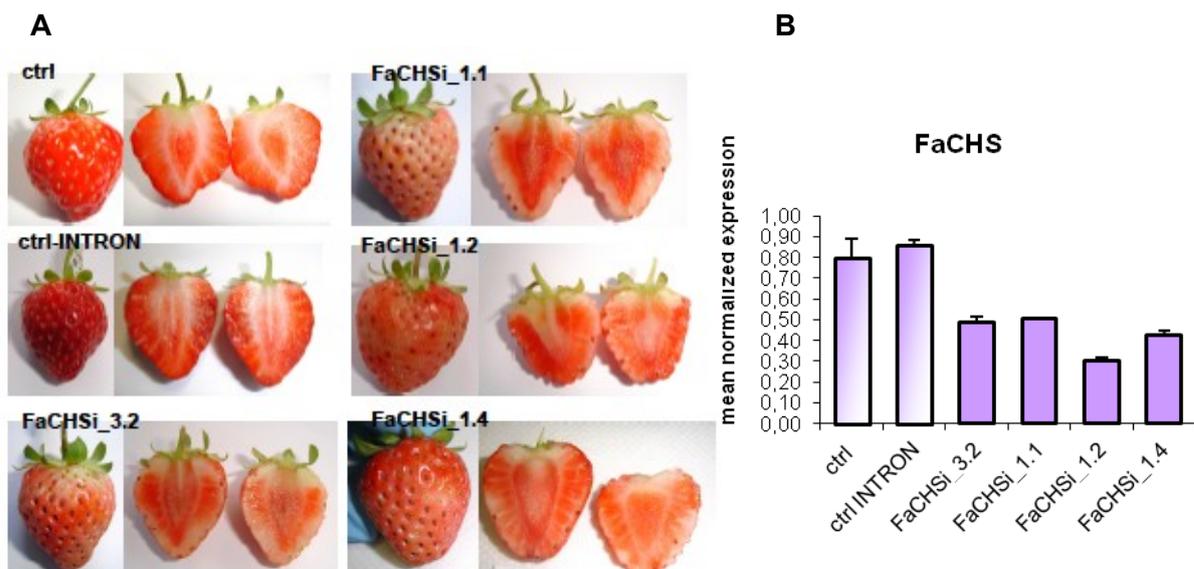


Figura 4.1.4: Silenziamento transiente del gene *FaCHS*. (A) Esempio di frutti campionati allo stadio rosso non trattati (ctrl), agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron (ctrl INTRON) e caratterizzati da una ridotta pigmentazione, in seguito all'agroinfiltrazione con il costrutto pBINplus_*FaCHSi* (*FaCHSi*_). (B) Espressione del gene *FaCHS*, analizzata mediante *real-time* pcr, in quattro frutti non trattati (ctrl), in quattro frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron (ctrl INTRON) e nei singoli frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_*FaCHSi* (*FaCHSi*_). Le barre d'errore nelle prime due colonne rappresentano la D.S. delle quattro repliche biologiche, le altre rappresentano la D.S. di tre repliche tecniche.

Per quanto concerne il silenziamento e la sovra-espressione del gene *FaSHP*, al fine di valutare l'efficienza dei trattamenti è stata analizzata mediante *real-time* PCR l'espressione del gene in frutti campionati allo stadio rosa. Questo è infatti il momento in cui i processi metabolici collegati alla maturazione sono maggiormente attivi e *FaSHP* dovrebbe essere al suo massimo di espressione. Considerando che in diversi campioni è stata rilevata una consistente riduzione nel caso del silenziamento, ed un consistente aumento nel caso della sovra-espressione dell'espressione di *FaSHP*, si è deciso di focalizzare l'attenzione sui 5 frutti maggiormente silenziati e sui 5 frutti caratterizzati dalla più elevata espressione del gene (figura 4.1.5).

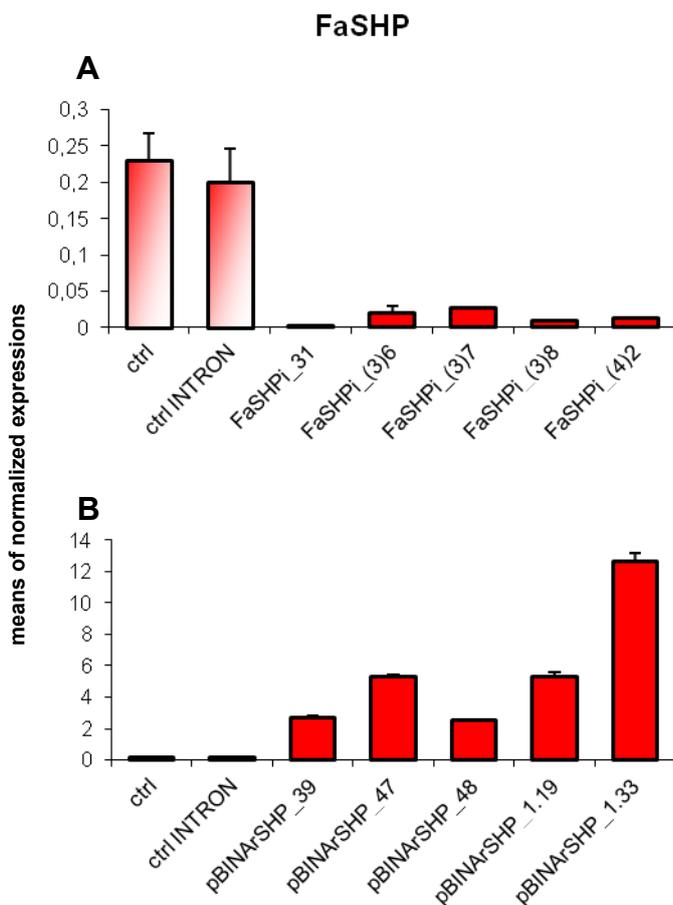
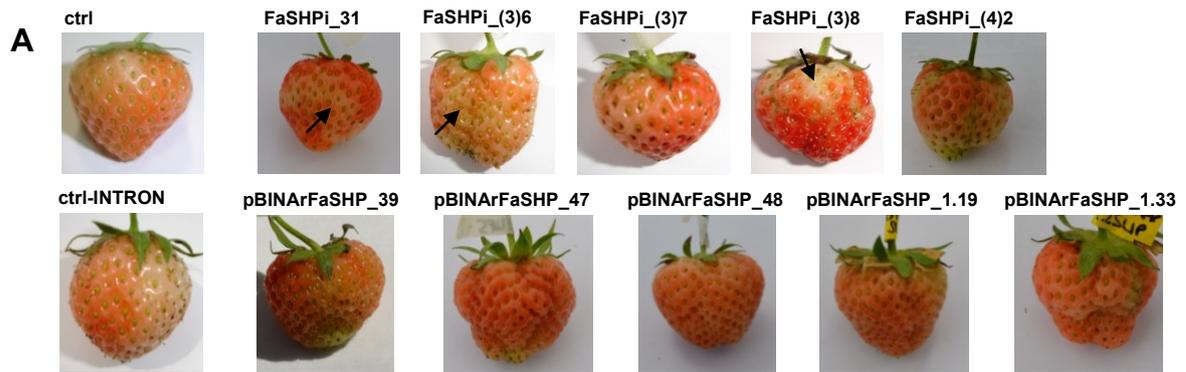


Figura 4.1.5: Analisi di espressione del gene *FaSHP*, ottenuta mediante esperimenti di *real-time* PCR, in (A) singoli frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_*FaSHPi* (*FaSHPi*_) e in (B) singoli frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINAr_*FaSHP* (pBINArSHP_).

In entrambi i grafici i dati relativi ai frutti non trattati (ctrl) e a quelli agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron (ctrl INTRON), sono il risultato della media di cinque frutti. Le barre d'errore nelle prime due colonne rappresentano la D.S. delle cinque repliche biologiche, le altre rappresentano la D.S. di tre repliche tecniche.

E' interessante notare che, in seguito all'agroinfiltrazione, questi frutti raggiungono lo stadio rosa rispettivamente più lentamente (Fig. 4.1.6 B) e più velocemente (figura 4.1.6 B) rispetto ai controlli. Inoltre, nei frutti caratterizzati da un'espressione di *FaSHP* assai ridotta, la comparsa della pigmentazione risulta essere poco omogenea, come indicano le frecce in figura 4.1.6 A. Ciò induce a pensare ad un rallentamento e ad una accelerazione della maturazione rispettivamente nei frutti sotto- e sovra- esprimenti *FaSHP*.



B

| agroinfiltrazioni | giorni |
|---------------------|-------------|
| ctrl (non trattato) | 6,3 ± 1,2 |
| pBINplus_intron | 6,7 ± 1,3 |
| pBINplus_FaSHPi | 9,8 ± 1,8 * |
| pBINAr_FaSHP | 5,2 ± 1,2 * |

Figura 4.1.6: (A) Frutti campionati allo stadio rosa non trattati (ctrl), agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron (ctrl INTRON), agroinfiltrati con i costrutti pBINplus_FaSHPi e pBINAr_FaSHP caratterizzati rispettivamente dal maggior silenziamento (pBINplus_FaSHPi) e sovra-espressione (pBINArFaSHP) di *FaSHP*. Le frecce indicano la pigmentazione non omogenea nei frutti con ridotta espressione di *FaSHP*. (B) Numero medio ± D.S. dei giorni impiegati da 5 frutti non trattati (ctrl), da 5 frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron e dai frutti degli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione rappresentati in A, per raggiungere lo stadio rosa in seguito all'agroinfiltrazione. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la casella indicata e la casella pBINplus_intron ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

omogenea nei frutti con ridotta espressione di *FaSHP*. (B) Numero medio ± D.S. dei giorni impiegati da 5 frutti non trattati (ctrl), da 5 frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron e dai frutti degli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione rappresentati in A, per raggiungere lo stadio rosa in seguito all'agroinfiltrazione. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la casella indicata e la casella pBINplus_intron ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

Prima di procedere a qualsiasi altro tipo di analisi si è deciso di valutare nei frutti riportati in figura 4.1.6 l'espressione del gene *STAG1*. Questo per accertare che le alterazioni osservate nei frutti considerati, in particolare in quelli sotto-esprimenti *FaSHP*, siano da attribuire in modo specifico alla modificata espressione del gene oggetto di studio. I cDNA di *FaSHP* e *STAG1* presentano una percentuale di identità nucleotidica del 61,5% pertanto, pur avendo costruito il costrutto per l'*RNA interference* di *FaSHP* nella zona meno conservata del cDNA, vi è un certo rischio di silenziamento aspecifico. Come si può osservare in figura 4.1.7 non vi è alterazione di espressione di *STAG1* nei frutti sotto-esprimenti *FaSHP*, ciò conferma la specificità del silenziamento del gene. Inoltre il fatto

che anche nei frutti sovra-espressanti *FaSHP* non vi sia modifica nell'espressione di *STAG1* suggerisce che *FaSHP* intervenga nella maturazione indipendentemente da *STAG1* e ciò supporta l'idea che *STAG1* non sia particolarmente coinvolto nella maturazione del frutto.

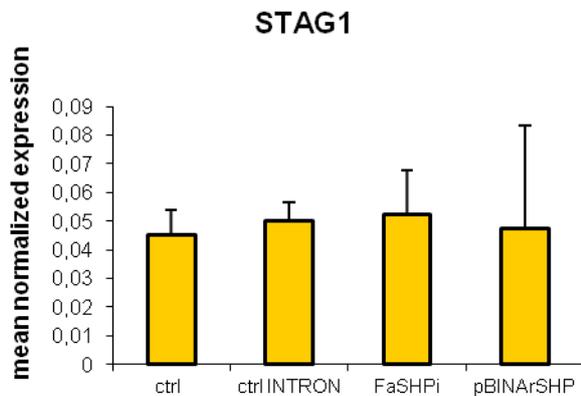


Figura 4.1.7: Analisi di espressione del gene *STAG1* mediante esperimenti di *real-time* PCR. (ctrl) frutti non agroinfiltrati, (ctrl INTRON) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron, (FaSHPi) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_FaSHPi caratterizzati dal maggior silenziamento e (pBINArSHP) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINAr_FaSHP caratterizzati dalla maggior sovra-espressione. Le barre di errore indicano le D.S. delle medie di cinque frutti.

4.1.4 Analisi di espressione di geni coinvolti nella maturazione di fragola, cultivar *Elsanta*

Alla luce dei dati ottenuti si è pensato di investigare se la variazione dell'espressione di *FaSHP* possa aver modificato qualche aspetto della sindrome di maturazione (metabolismo delle pareti cellulari, biosintesi di composti fenolici e biosintesi di altri metaboliti specifici del frutto). Sono stati dunque scelti dei geni espressi durante la maturazione da utilizzare quali marcatori di ciascuno di questi processi. Tuttavia prima di procedere ad analizzarne l'espressione nei frutti caratterizzati da una modificata espressione di *FaSHP*, ne è stato valutato il profilo di espressione, utilizzando la stessa serie di tessuti impiegata per i geni *FaSHP* e *STAG1*. Questa analisi preliminare nella cultivar impiegata per gli esperimenti si è resa necessaria, considerando che i geni di seguito riportati sono stati originariamente studiati con tecniche non confrontabili in cultivar differenti ed è noto che tra varietà diverse di fragole vi possono essere differenze anche importanti nella maturazione. Inoltre molti dei geni considerati fanno parte di famiglie multigeniche ed è dunque indispensabile essere sicuri che quelli selezionati siano maturazione-specifici.

Come descritto nell'introduzione (paragrafo 1.2.2), il rammollimento del frutto di fragola è associato ad un attivo metabolismo delle componenti pectica ed emicellulosica della parete cellulare. Si è pertanto scelto di considerare due geni coinvolti nel metabolismo delle pectine, *FaPGI* e *FaPL*, i quali codificano rispettivamente per una poligalatturonasi (Quesada *et al.*, 2009) ed una pectato liasi (Medina-Escobar *et al.*, 1997), ed un gene coinvolto nel metabolismo delle emicellulose, *FaEGI*, che codifica per una endo- β -1,4-glucanasi (Trainotti *et al.*, 1999). Come si può osservare in figura 4.1.8 A tutti e tre i geni

considerati presentano un profilo di espressione frutto e maturazione specifico, i trascritti cominciano infatti ad accumularsi in modo apprezzabile negli stadi bianco1 e 2 e raggiungono un picco nel frutto rosa, stadio in cui il metabolismo delle pareti cellulari è particolarmente attivo.

Durante la maturazione del frutto di fragola, accanto al rammollimento, si verificano altre modifiche importanti quali la comparsa del colore rosso e la formazione dell'aroma. Tra i metaboliti secondari che contribuiscono a questi aspetti un ruolo prominente è svolto dai composti fenolici. Si è dunque scelto di analizzare l'espressione dei geni *FaPAL6* (Pombo *et al.*, 2011) e *FaCHS* (Lunkenbein *et al.*, 2006), i quali codificano rispettivamente per due isoforme degli enzimi fenilalanina ammonio liasi e calcone sintasi (paragrafo 1.2.2). Entrambi i geni sono espressi in tutti i campioni, sebbene i livelli più elevati dei trascritti si trovino nelle fragole in maturazione allo stadio rosa (figura 4.1.8 B). Il gene *FaPAL6* presenta anche un picco minore nello stadio di frutto verde (Almeida *et al.*, 2007). Il massimo di espressione osservato nei frutti rosa è chiaramente associato alla sintesi delle antocianine e dei loro precursori che determinano la colorazione del frutto, mentre il picco minore osservato per *FaPAL6* nei frutti verdi è probabilmente associato ad altri ruoli svolti dai composti fenolici, quali possono essere la protezione dall'attacco di organismi patogeni o da condizioni ambientali avverse. Si può osservare come i due geni siano espressi anche nelle foglie e nei fiori, è noto infatti che nelle foglie i composti fenolici presenti forniscono protezione dai raggi UV, mentre nei fiori hanno il compito di attrarre gli impollinatori (Almeida *et al.*, 2007).

Sono stati infine presi in considerazione due geni coinvolti nella biosintesi di altri metaboliti frutto-specifici importanti per le proprietà organolettiche del frutto. Il primo gene, *FaQR*, codifica per una chinone reduttasi coinvolta nella biosintesi del furaneolo, il principale composto aromatico di fragola (Raab *et al.*, 2006, paragrafo 1.2.2). I dati di *real-time* PCR ottenuti (figura 4.1.8 C) indicano un pattern di espressione maturazione specifico, l'accumulo dei trascritti risulta infatti apprezzabile a partire dalla fase di frutto rosa. Il secondo gene, *FaGalUR*, codifica invece per l'enzima galatturonato reduttasi implicato nella biosintesi dell'acido ascorbico (Agius *et al.*, 2003, paragrafo 1.2.2). Come si può osservare in figura 4.1.8 C, tale gene è espresso in modo crescente durante lo sviluppo del frutto ma è anche presente in foglie e fiori. Sembra dunque che *FaGalUR*, oltre ad essere importante per la produzione di acido ascorbico nel frutto (Cruz-Rus *et al.*, 2011), intervenga nella sua sintesi anche in altri tessuti, la presenza ubiquitaria di tale composto nei tessuti è in linea con la sua comprovata essenzialità per lo sviluppo della pianta (Dowdle *et al.*, 2007).

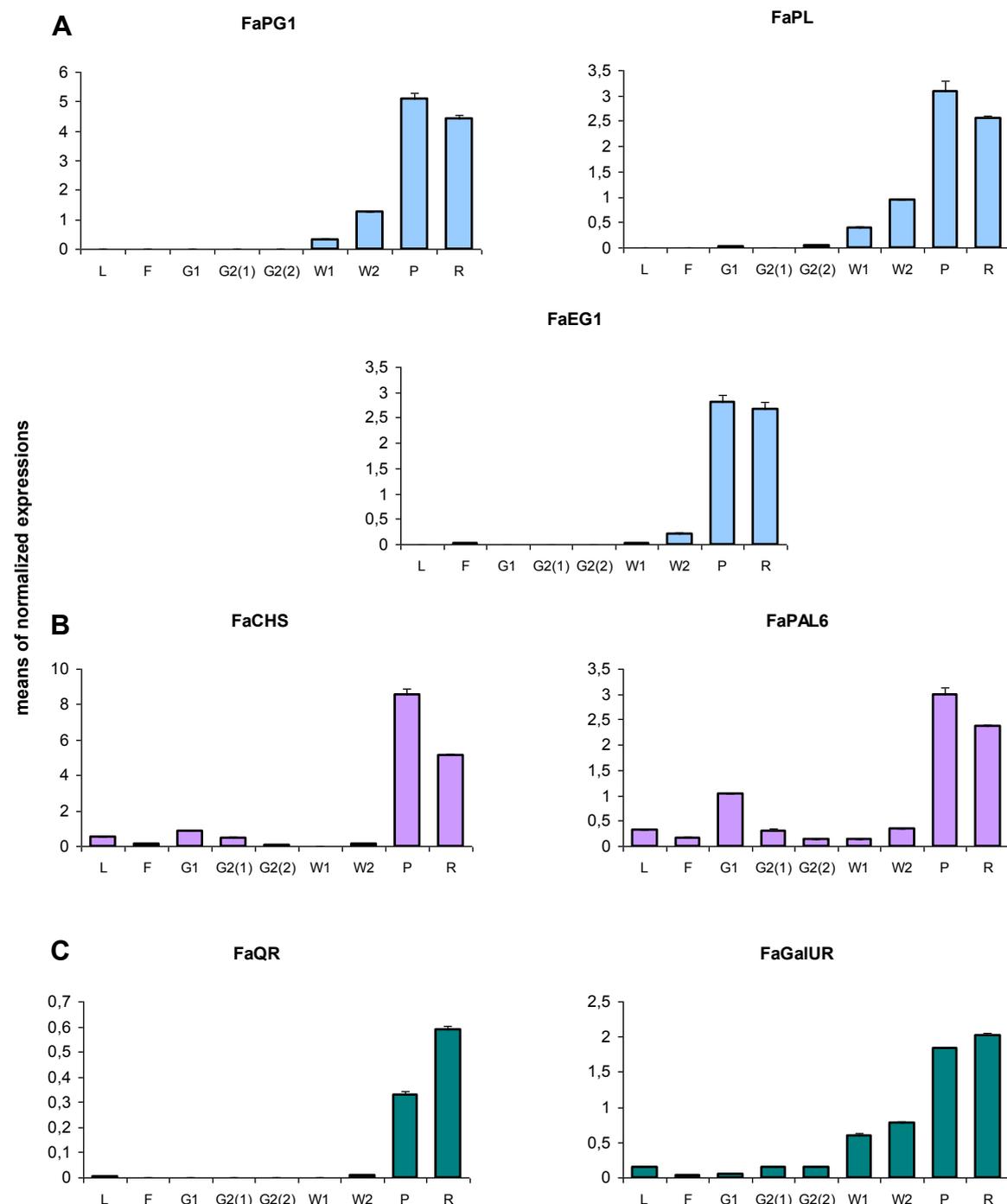


Figura 4.1.8: Profili di espressione, ottenuti mediante esperimenti di *real-time* PCR, di geni implicati nella sindrome di maturazione codificanti (A) enzimi del rammollimento, (B) enzimi della biosintesi di composti fenolici (C) enzimi della biosintesi di altri metaboliti frutto-specifici. L: foglia, F: fiore, G1: frutto verde piccolo, G2(1): frutto verde grande 1, G2(2): frutto verde grande 2, W1: frutto bianco 1, W2: frutto bianco 2, P: frutto rosa, R: frutto rosso. Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie di tre repliche.

Accanto ai geni implicati nella sindrome di maturazione si è deciso di considerare anche i pochi geni codificanti fattori di trascrizione noti per essere espressi durante la maturazione del frutto. Come già sottolineato nell'introduzione (paragrafo 1.2.4), questi comprendono due geni codificanti per fattori di trascrizione MYB (*FaMYB10* e *FaMYB1*) coinvolti nel regolare la produzione di composti fenolici (Lin-Wang *et al.*, 2010, Aharoni *et al.*, 2001), ed un fattore di trascrizione MADS-box (*FaMads9*), al quale è stato attribuito un ruolo in qualità di regolatore generale dello sviluppo del frutto (Seymour *et al.*, 2011). I dati riportati in figura 4.1.9 mostrano come l'espressione di entrambi i geni *MYB* aumenti durante la maturazione. *FaMYB1* è espresso anche nel fiore e nelle prime fasi di sviluppo del frutto a livelli tra di loro confrontabili, mentre *FaMYB10* è espresso negli stessi stadi ad un livello appena rilevabile. Inoltre il grafico evidenzia come l'aumento di espressione di *FaMYB10* all'inizio della maturazione sia molto più marcato rispetto a quello di *FaMYB1*, ciò suggerisce un più diretto coinvolgimento del primo dei due geni durante la maturazione, come già dimostrato dal suo intervento nel mediare la produzione delle antocianine (Lin-Wang *et al.*, 2010). Infine *FaMads9* oltre ad essere espresso con profilo crescente durante la maturazione del frutto è espresso anche nel fiore e nel frutto (figura 4.1.9) a supporto del ruolo già delineato per questo gene durante lo sviluppo del fiore e del frutto (Seymour *et al.*, 2011).

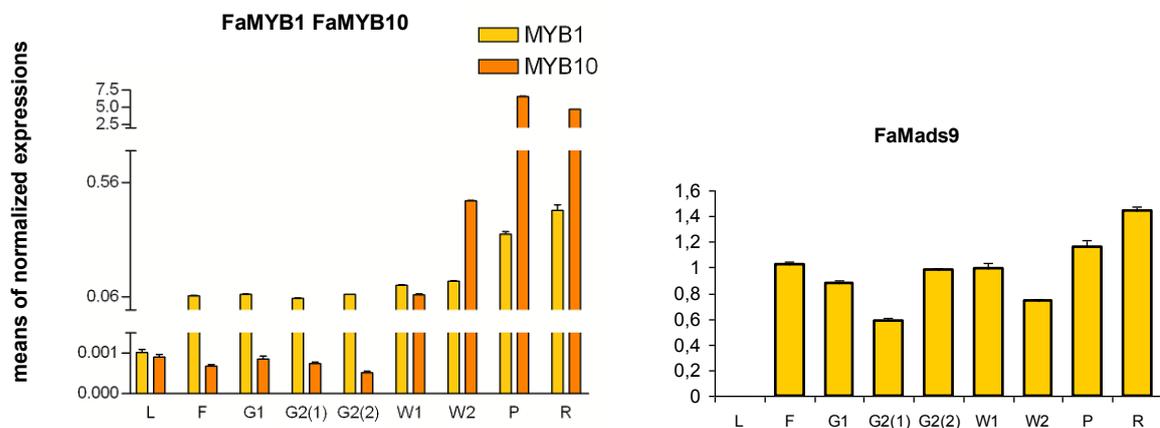


Figura 4.1.9: Profili di espressione, ottenuti mediante esperimenti di *real-time* PCR di geni codificanti fattori di trascrizione espressi durante la maturazione. L: foglia, F: fiore, G1: frutto verde piccolo, G2(1): frutto verde grande 1, G2(2): frutto verde grande 2, W1: frutto bianco 1, W2: frutto bianco 2, P: frutto rosa, R: frutto rosso. Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie di tre repliche.

4.1.5 Effetti del silenziamento e della sovra-espressione del gene *FaSHP* sulla maturazione del frutto: analisi di espressione di geni marcatori

Dopo aver analizzato il profilo di espressione dei geni scelti quali marcatori del processo di maturazione, si è proceduto a valutarne l'espressione mediante *real-time* PCR nei frutti caratterizzati rispettivamente da un'espressione di *FaSHP* particolarmente ridotta o elevata (figure 4.1.5 e 4.1.6). Parallelamente l'espressione degli stessi geni è stata valutata anche in cinque frutti non trattati ed in cinque frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron. I dati di espressione ottenuti per i frutti sotto- e sovra-esprimenti *FaSHP* sono stati analizzati facendo in particolar modo riferimento al secondo dei due controlli, dal momento che i frutti sottoposti ad agroinfiltrazione con i diversi costrutti si trovano nelle stesse condizioni fisiologiche.

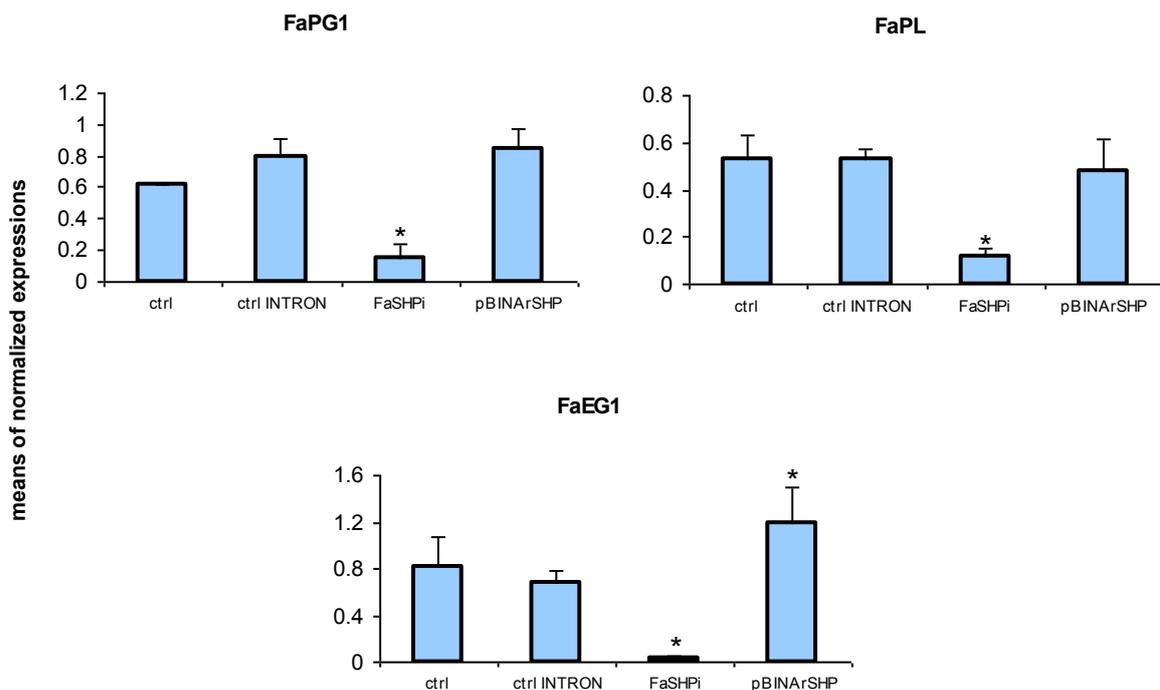
In prima istanza l'attenzione è stata focalizzata sui geni marcatori codificanti enzimi coinvolti nelle modifiche caratteristiche del processo di maturazione. Come si può osservare nei grafici riportati in figura 4.1.10, nei frutti caratterizzati da una ridotta espressione del gene *FaSHP* vi è una riduzione nell'espressione di tutti i geni considerati. In alcuni casi tale riduzione è molto marcata come per *FaEGI*, in altri meno ad esempio *FaGalUR*; tuttavia per tutti i geni analizzati tale riduzione è statisticamente significativa. E' interessante osservare come questa diminuzione sia tanto più pronunciata nel caso dei geni (*FaCHS*, *FaEGI*, *FaQR*) che presentano un consistente aumento nell'accumulo dei trascritti nel passaggio dal frutto bianco a quello rosa (figura 4.1.8). Di particolare rilievo è la ridotta espressione dei geni *FaPAL6* e *FaCHS*, la quale ben correla con la pigmentazione poco omogenea dei frutti considerati (figura 4.1.6 A). Infatti, come già dimostrato (Hoffmann *et al.*, 2006) e ulteriormente provato mediante silenziamento transiente del gene (figura 4.1.4), *FaCHS* interviene nella produzione delle antocianine, mentre *FaPAL6* agisce all'inizio della via biosintetica dei fenoli e, quindi, a monte di *FaCHS*. Sebbene non vi siano dati molecolari che correlano la funzione del gene *PAL* alla produzione di antocianine, è stato dimostrato che l'attività enzimatica PAL è implicata nell'accumulo di questi pigmenti (Given *et al.*, 1988).

In generale, il fatto che geni implicati in varie vie metaboliche coinvolte nella maturazione vengano sotto-espressi suggerisce un rallentamento della maturazione in questi frutti, in accordo con il maggior tempo necessario per raggiungere la fase di frutto rosa (figura 4.1.6 B).

Dal momento che la riduzione dell'espressione di *FaSHP* porta ad una diminuzione nell'espressione di tutti i geni marcatori considerati, ci si potrebbe aspettare che l'aumentata espressione di *FaSHP* determini un aumento nell'espressione degli stessi geni. I dati riportati nei grafici della figura 4.1.10 mostrano invece come nei frutti sovra-esprimenti

FaSHP la maggior parte dei geni marcatori non presenti variazione di espressione rispetto ai controlli. Poiché, come messo in evidenza dai pattern ottenuti mediante *real-time* PCR (figura 4.1.8), l'espressione dei geni considerati aumenta in maniera consistente durante la maturazione, potrebbe essere che un ulteriore aumento dell'espressione possa aver innescato un meccanismo di controllo a *feedback* negativo su una loro ulteriore trascrizione. Tuttavia, non tutti i geni considerati presentano un'assenza di variazione trascrizionale nei frutti sovra-esprimenti *FaSHP*. Infatti, come si può osservare in figura 4.1.10, i geni *FaEG1* e *FaGalUR* vanno incontro ad un aumento di espressione statisticamente significativo. L'aumento nell'espressione di questi due geni suggerisce una qualche variazione nel trascrittoma di questi frutti, che può rendere conto del minor tempo necessario per raggiungere la fase di frutto rosa (figura 4.1.6 B). Inoltre, la risposta dei geni *FaEG1* e *FaGalUR* all'aumentata espressione di *FaSHP* induce a pensare che questi due geni possano essere regolati direttamente da *FaSHP*.

Sulla base dei dati di espressione ottenuti, si può ipotizzare che *FaSHP* possa avere un ruolo di regolatore generale della maturazione. In analogia con quanto messo in evidenza per la maturazione del frutto di pomodoro (Klee *and* Giovannoni, 2011), è plausibile pensare che *FaSHP* sia inserito in un complesso *network* molecolare in cui vi sono più punti di controllo. *FaSHP* potrebbe controllare direttamente alcune vie metaboliche, rappresentate magari dai geni la cui espressione aumenta nella sovra-espressione, ed intervenire nel controllo di altri aspetti attraverso degli intermediari situati a valle nella via di controllo della maturazione.



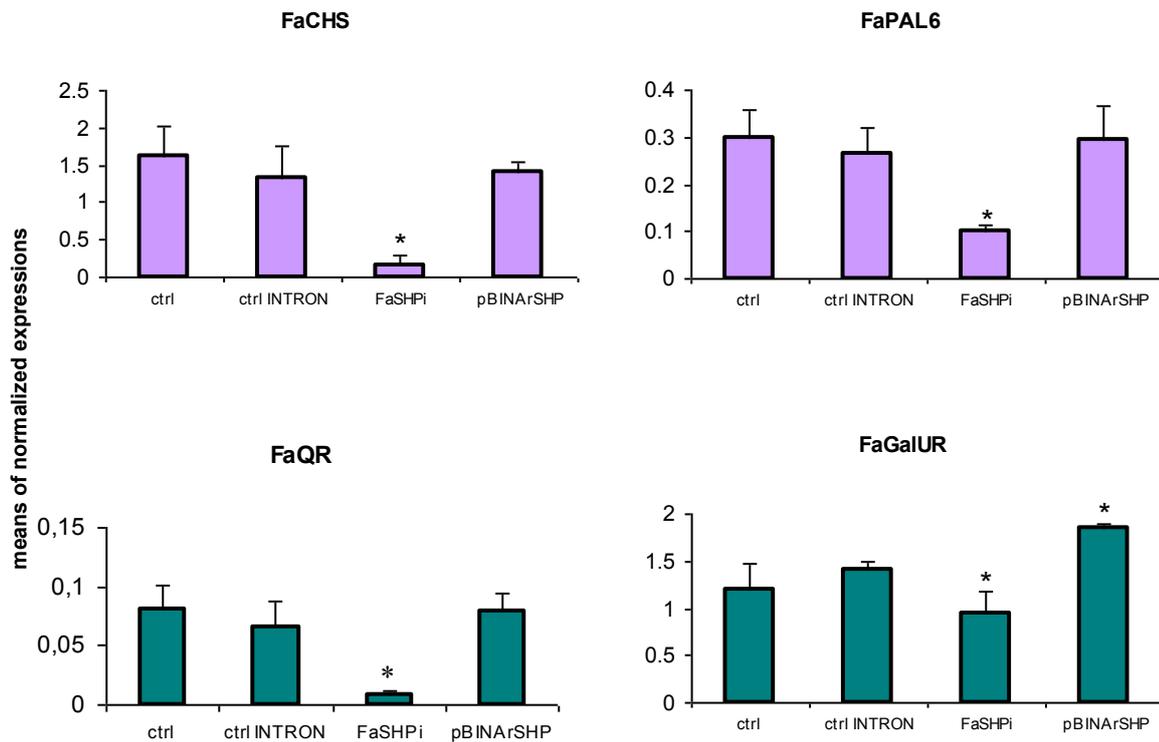


Figura 4.1.10: Analisi di espressione dei geni selezionati quali marcatori del processo di maturazione, mediante esperimenti di *real-time* PCR. (ctrl) frutti non agroinfiltrati, (ctrl INTRON) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron, (FaSHPi) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_FaSHPi e (pBINArSHP) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINAr_FaSHPi. Le barre di errore indicano le D.S. delle medie di cinque frutti. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna indicata e quella relativa all'agroinfiltrazione di controllo (ctrl INTRON) ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

4.1.6 Collocazione del gene *FaSHP* nel *network* molecolare che regola la maturazione: analisi di espressione di fattori di trascrizione nei frutti sotto- e sovra-esprimenti *FaSHP*

Dato che l'analisi dei geni di maturazione nei frutti sotto- e sovra- esprimenti *FaSHP* depone a favore di un ruolo in qualità di regolatore della maturazione per *FaSHP*, si è cercato di collocare tale gene nel *network* molecolare che regola questo processo, analizzando l'espressione dei pochi fattori di trascrizione noti per essere espressi nel frutto (figura 4.1.9). Anche in questo caso l'analisi è stata condotta nei frutti riportati in figura 4.1.6, utilizzando come riferimento i controlli descritti nel paragrafo precedente.

Per quanto riguarda *FaMYB1* (figura 4.1.11) si ripresenta ciò che è stato osservato per la maggior parte dei geni di maturazione sopra-considerati: nei frutti silenziati la sua

espressione è ridotta, mentre nei sovra-esprimenti non vi sono variazioni rispetto ai controlli, la spiegazione potrebbe essere quella sopra-riportata per i geni di maturazione. Nel caso invece dei geni *FaMYB10* e *FaMads9* (figura 4.1.11), la ridotta e l'aumentata espressione rispettivamente nei frutti sotto- e sovra-esprimenti *FaSHP* indica che questi due geni agiscono a valle di *FaSHP*. Relativamente a *FaMYB10*, tale risultato supporta l'idea che l'azione di *FaSHP* sia mediata da altri fattori, in particolare *FaMYB10* potrebbe regolare l'espressione di un enzima più direttamente coinvolto nella biosintesi delle antocianine (Lin-Wang *et al.*, 2010). Questi dati, seppur limitati ad un ristretto numero di fattori di trascrizione, depongono a favore di un ruolo precoce per *FaSHP* nel *network* molecolare che controlla la maturazione del frutto.

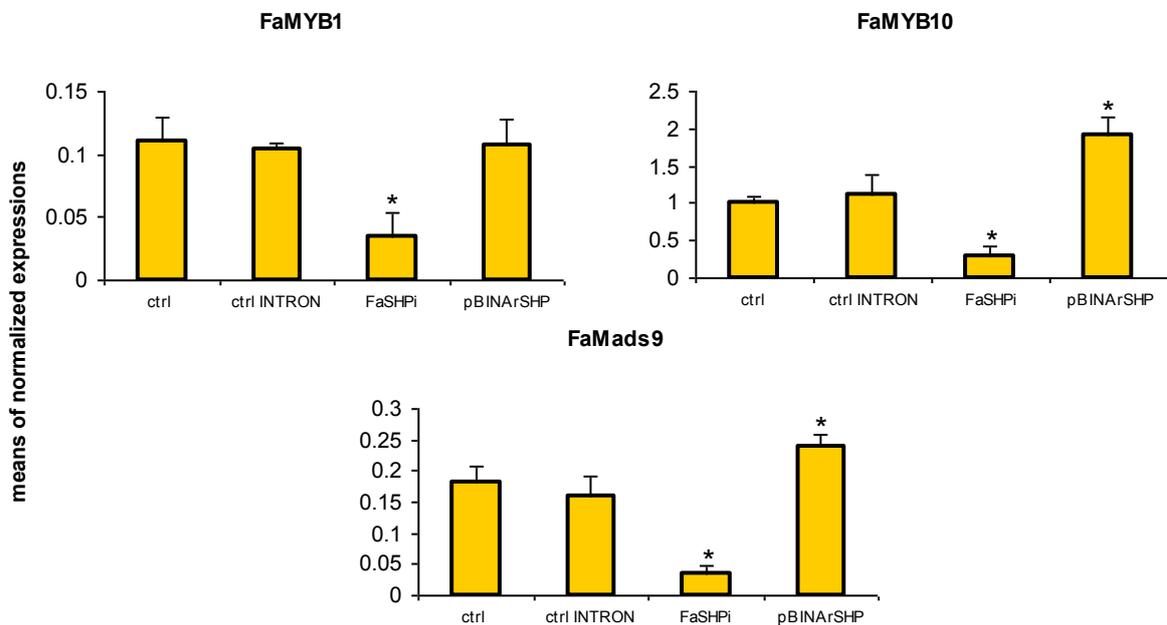


Figura 4.1.11: Analisi di espressione dei geni codificanti fattori di trascrizione espressi nel frutto, mediante esperimenti di *real-time* PCR. (ctrl) Frutti non agroinfiltrati, (ctrl INTRON) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_intron, (FaSHPi) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINplus_FaSHPi e (pBINArSHP) frutti agroinfiltrati con il costrutto pBINAr_FaSHP. Le barre di errore indicano le D.S. delle medie di cinque frutti. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna indicata e quella relativa all'agroinfiltrazione di controllo (ctrl INTRON) ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

4.1.7 *FaSHP* e la regolazione ormonale della maturazione del frutto

Alla luce del ruolo ipotizzato per *FaSHP*, ci si è chiesti se la sua azione possa essere a sua volta regolata da qualche altro fattore. L'attenzione è stata dunque volta ai fattori ormonali che intervengono nella maturazione del frutto. Come riportato nell'introduzione (paragrafo 1.2.3) i dati ad oggi presenti in letteratura sembrano imputare all'auxina ed all'ABA un ruolo di controllo chiave nella maturazione del frutto di fragola. In particolare l'auxina svolge una regolazione negativa, mentre l'ABA esplica un'azione positiva, i due ormoni hanno dunque un effetto antagonistico sulla maturazione del frutto.

Per verificare il possibile effetto di questi ormoni sull'azione di *FaSHP*, due serie di frutti bianchi (stadio bianco 2) staccati dalla pianta sono stati trattati in modo indipendente con i due ormoni [rispettivamente NAA (un analogo dell'auxina) ed ABA]. A controllo dell'esperimento un'altra serie di frutti bianchi è stata sottoposta, in assenza di ormoni, alle stesse condizioni sperimentali dei frutti trattati (paragrafo 3.2.16). Si è scelto di condurre gli esperimenti su frutti a questo stadio di sviluppo perché l'espressione di *FaSHP* è in fase di crescita ed eventuali modifiche dovrebbero poter essere facilmente apprezzate anche nel caso di trattamenti di durata limitata. I frutti così trattati sono stati campionati dopo 2, 4, 6, 12 e 18 ore dal trattamento e l'espressione di *FaSHP* è stata analizzata, mediante *real-time* PCR, nei diversi campioni.

Come si può osservare nei grafici riportati in figura 4.1.12, l'espressione di *FaSHP* aumenta nei controlli nel corso delle 18 ore, pertanto la maturazione procede anche nei frutti distaccati dalla pianta, inoltre è chiaramente visibile come nei frutti sottoposti ai due trattamenti ormonali vi sia variazione di espressione rispetto ai controlli. In particolare nei campioni trattati con NAA (figura 4.1.12 A), si osserva una significativa riduzione dell'espressione di *FaSHP* già dopo 2 ore dal trattamento, che permane nel corso di tutto l'esperimento. Nei frutti trattati con ABA (figura 4.1.12 B) si assiste invece ad un aumento dell'espressione di *FaSHP*, che si può apprezzare a partire da 4 ore dopo il trattamento e risulta essere più marcata nell'ultimo campionamento.

Questi risultati indicano che l'espressione di *FaSHP* è regolata negativamente dall'auxina e positivamente dall'ABA; nel frutto di fragola il controllo da parte di questi due ormoni agisce dunque a monte del fattore di trascrizione in analisi.

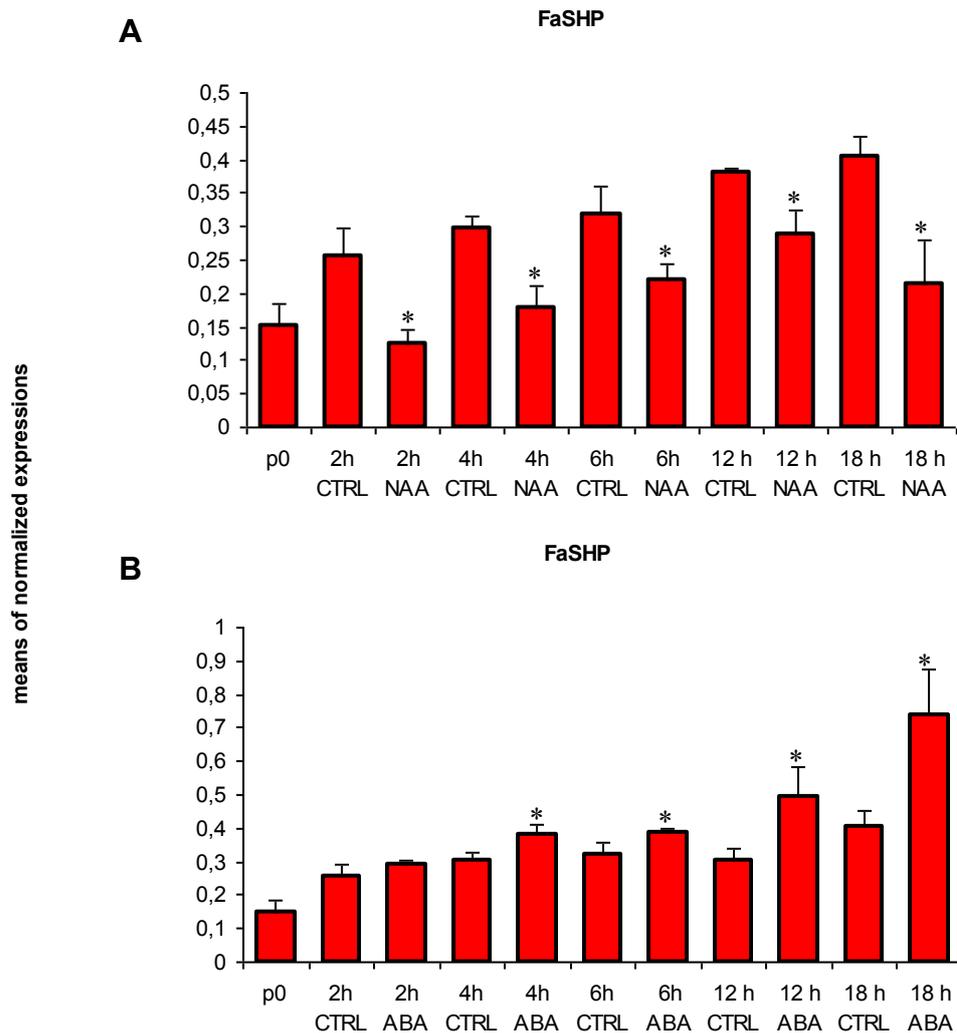


Figura 4.1.12: Analisi di espressione del gene *FaSHP*, ottenuta mediante esperimenti di *real-time* PCR, in frutti bianchi campionati al punto zero (p0) e dopo 2, 4, 6, 12, 18 ore dal trattamento con (A) NAA e (B) ABA. I controlli si riferiscono a frutti sottoposti, in assenza di ormoni, alle stesse condizioni sperimentali dei frutti trattati. Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie di tre esperimenti. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna indicata e la corrispondente del controllo ($P < 0.05$, t-test).

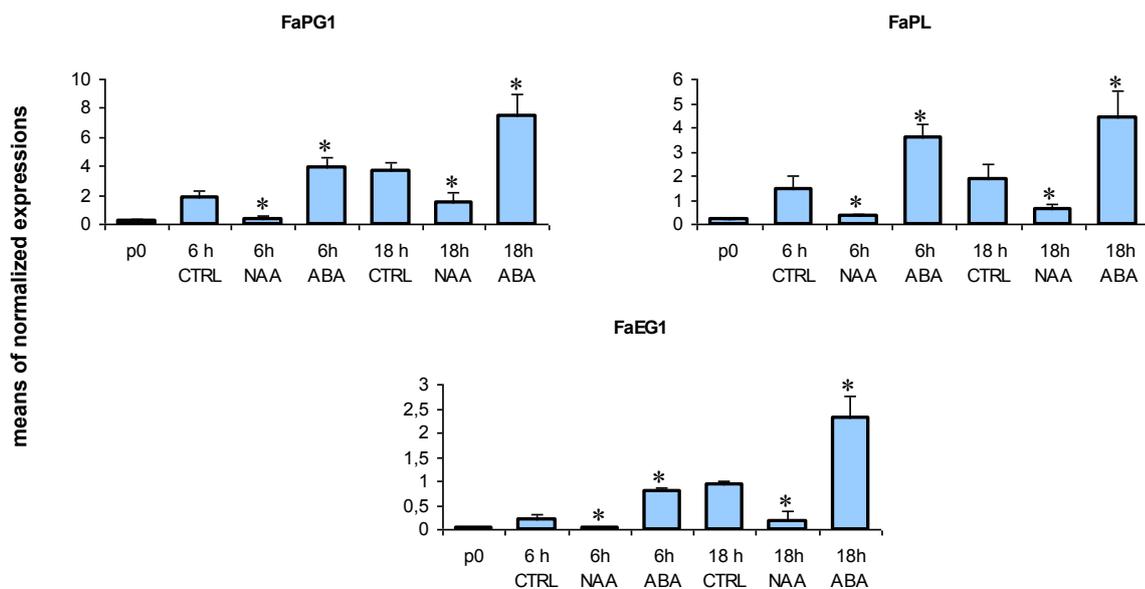
Infine, dal momento che tutti i geni considerati negli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione transiente rispondono alla variazione dell'espressione di *FaSHP*, è stata valutata anche la loro risposta agli ormoni, analizzandone l'espressione nei frutti campionati dopo 6 e 18 ore dal trattamento con NAA ed ABA. Come si può osservare in figura 4.1.13, solo nel caso di *STAG1* nessuno dei due trattamenti ormonali determina apprezzabili variazioni nell'espressione del gene, a conferma del fatto che tale gene non interviene nel *network* molecolare che regola la maturazione. Dunque per tutti gli altri geni, sia quelli scelti quali marcatori della maturazione, sia quelli codificanti fattori di

trascrizione, si osservano invece una riduzione ed un aumento nei frutti trattati rispettivamente con NAA ed ABA. In alcuni casi ciò si può già apprezzare nei frutti campionati dopo 6 ore di trattamento (esempio *FaPL*), l'effetto è comunque per tutti evidente alle 18 ore (unica eccezione *FaGalUR* 18h NAA).

Relativamente al trattamento con NAA tali risultati confermano l'effetto inibitorio dell'auxina sull'espressione di geni coinvolti nella maturazione, già pubblicato per *FaCHS*, *FaPL*, *FaEG1*, *FaQR* e *FaPG* (Manning *et al.*, 1994; Medina-Escobar *et al.*, 1997; Trainotti *et al.*, 1999; Raab *et al.*, 2006; Quesada *et al.*, 2009) e lo estendono agli altri geni e fattori di trascrizione analizzati. Per quanto concerne l'ABA, è già stato dimostrato che il trattamento con tale ormone è in grado di accelerare la maturazione del frutto, determinando un aumento del rammollimento e della pigmentazione del frutto (Jia *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011), tuttavia questi sono i primi dati molecolari ad evidenziare il ruolo positivo dell'ABA su vari aspetti della sindrome di maturazione.

Nel complesso i dati di espressione genica ottenuti confermano il coinvolgimento dei geni considerati nella maturazione del frutto e ne dimostrano la regolazione da parte dei due ormoni considerati, supportandone l'effetto antagonistico sulla maturazione.

Considerando infine che ABA ed auxina hanno uguale effetto su questi geni e su *FaSHP* e che quest'ultimo sembra agire in qualità di regolatore generale della maturazione, è plausibile pensare che la risposta agli ormoni dei geni considerati possa essere, almeno in parte, mediata da *FaSHP*.



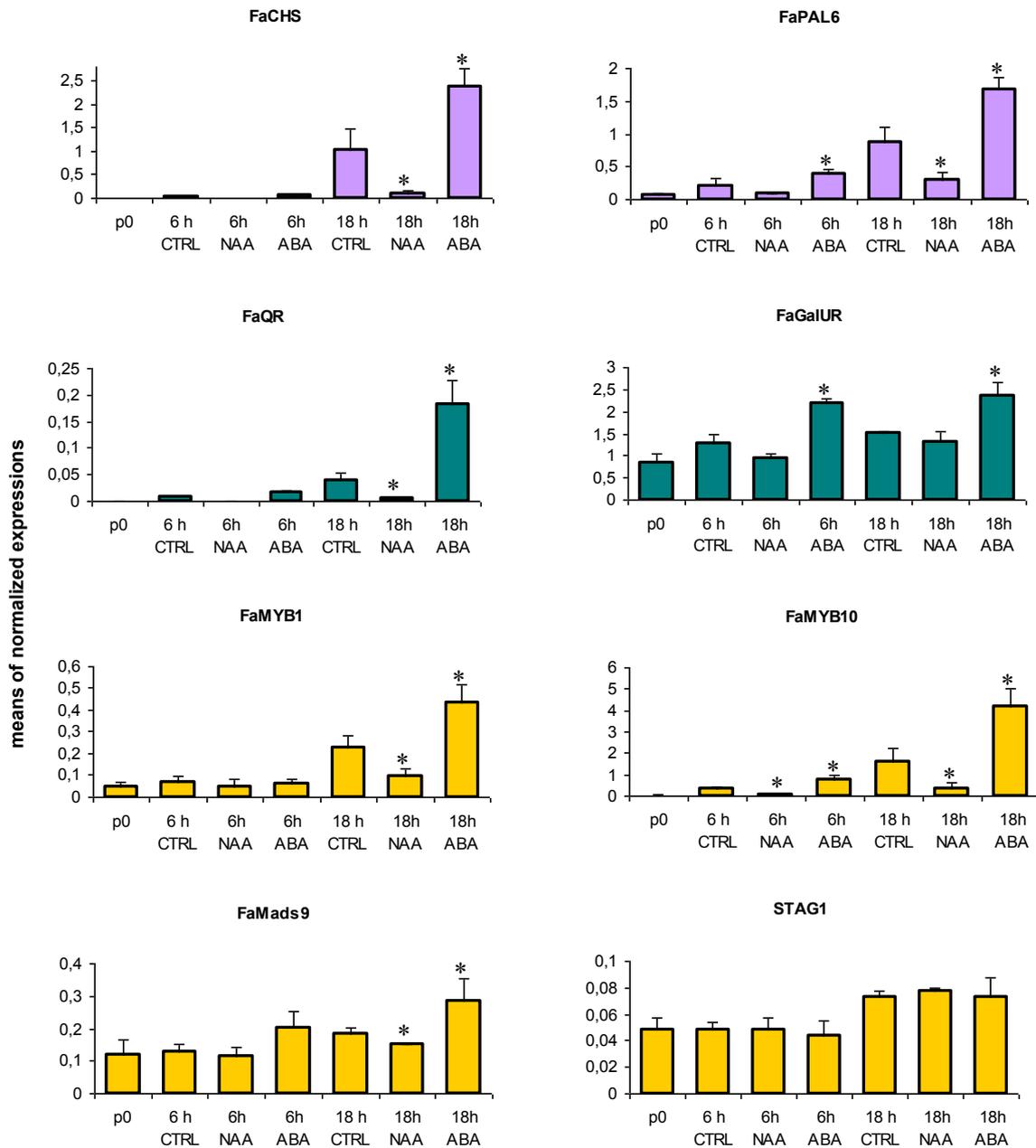


Figura 4.1.13: Analisi di espressione dei geni selezionati quali marcatori del processo di maturazione e codificanti fattori di trascrizione, ottenuta mediante esperimenti di *real-time* PCR, in frutti bianchi campionati al punto zero (p0) e dopo 6 e 18 ore dal trattamento con NAA e ABA. I controlli si riferiscono a frutti sottoposti, in assenza di ormoni, alle stesse condizioni sperimentali dei frutti trattati. Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie di tre esperimenti. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna indicata e la corrispondente del controllo ($P < 0.05$, t-test).

4.1.8 Conclusioni

Studi condotti negli ultimi anni hanno messo in evidenza come i geni MADS-box occupino una posizione prominente nei *network* molecolari che regolano la maturazione dei veri frutti (Klee *and* Giovannoni, 2011). Tra questi geni, in particolare, vari rappresentanti della sottofamiglia *AGAMOUS* intervengono nel controllo delle fasi terminali dello sviluppo dei frutti in specie appartenenti a famiglie diverse che producono sia frutti carnosi (pomodoro, pesco), sia secchi (*Arabidopsis*, tabacco), ciò indica che la loro funzione sia evolutivamente conservata (Smackznick *et al.*, 2012a; Fourquin *and* Ferrandiz, 2012).

La recente scoperta dell'espressione di alcuni di questi geni durante la maturazione delle strutture carnose delle Gimnosperme (Lovisetto *et al.*, 2012) ha portato ad ipotizzarne un più ampio ruolo nello sviluppo di strutture, anche aventi origine non strettamente ovarica, comunque deputate alla dispersione dei semi. Dal momento che le Gimnosperme non si prestano a studi funzionali con approcci di *reverse genetics*, l'attenzione è stata focalizzata in questo lavoro sulla fragola, una specie che produce un frutto di origine non ovarica, pertanto simile ai "frutti" delle Gimnosperme. È stato dunque isolato un gene (*FaSHP*), ortologo dei geni *AGAMOUS-like* per i quali è già stato definito un ruolo di regolazione delle fasi finali dello sviluppo del frutto (clade *PLENA*), il cui profilo di espressione maturazione-specifico ha subito fatto ipotizzare un possibile ruolo di controllo in questo processo.

Al fine di caratterizzare funzionalmente *FaSHP* sono stati condotti degli esperimenti di silenziamento e sovra-espressione transiente in frutti di fragola. Il rallentamento e l'accelerazione della maturazione riscontrati nei frutti rispettivamente sotto- e sovra-esprimenti il gene, insieme alla modificata espressione di vari geni marcatori del processo di maturazione, hanno portato a supporre che *FaSHP* possa essere uno dei protagonisti del *network* molecolare che regola la maturazione del frutto di fragola. Come già sottolineato nei risultati, è particolarmente interessante notare come le modifiche osservate nei frutti silenziati nell'espressione di *FaSHP* (comparsa poco omogenea della pigmentazione, ritardo nella maturazione, ridotta espressione di geni marcatori di maturazione) ripropongano le caratteristiche dei frutti di pomodoro sotto-esprimenti *TAGLI*, l'ortologo di *FaSHP*. Anche in questo caso, infatti, i frutti presentano una ridotta pigmentazione ed una riduzione nell'espressione di geni coinvolti in vari aspetti della sindrome di maturazione. In pomodoro *TAGLI* controlla la pigmentazione del frutto intervenendo nel metabolismo dei carotenoidi ed è stato dimostrato che il suo effetto sulla maturazione è mediato dall'ormone etilene (Gimenez *et al.*, 2010; Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009). Com'è noto, a differenza del pomodoro, la pigmentazione del frutto di fragola è dovuta all'accumulo di antocianine, inoltre fragola è un frutto non-climaterico e non

sembra che l'etilene abbia un effetto importante sulla maturazione del frutto (paragrafo 1.2.3). Risulta chiaro che il simile effetto del silenziamento di *FaSHP* e *TAGL1* sulla maturazione può essere spiegato assumendo che tali geni abbiano un ruolo precoce nei *network* molecolari che controllano la maturazione dei rispettivi frutti. Sembra pertanto che questi due fattori di trascrizione agiscano prima degli aspetti della sindrome frutto-specifici. Ciò depone a favore dell'esistenza di aspetti conservati nei meccanismi molecolari che regolano la maturazione in frutti con una differente fisiologia del processo (climaterici e non climaterici) (Giovannoni, 2004).

Il ruolo precoce di *FaSHP* nel controllo della maturazione del frutto di fragola è supportato dal fatto che, secondo i dati di espressione ottenuti, *FaSHP* sembra agire a monte dei fattori di trascrizione *FaMads9* e *FaMYB10*. La relazione molecolare con il gene *FaMads9*, un gene MADS-box di tipo *SEPALLATA* propone un'altra somiglianza con pomodoro, dove, secondo alcuni dati, *TAGL1* sembra intervenire prima di *RIN* (Giménez *et al.*, 2010; Klee *and* Giovannoni, 2011), un gene appartenente come *FaMads9* alla sottofamiglia *SEPALLATA*, considerato il regolatore centrale della maturazione in pomodoro (Osorio *et al.*, 2011) (paragrafo 1.3.1). Per quanto riguarda invece *FaMYB10*, il risultato ottenuto supporta l'idea che l'azione di *FaSHP* possa essere mediata, almeno per alcuni aspetti, da altri fattori. Dal momento che *FaSHP* è implicato precocemente nel controllo della maturazione, è plausibile che esso espliciti la sua attività controllando direttamente alcune vie metaboliche ed intervenga, invece, nel controllo di altri aspetti attraverso degli intermediari, come potrebbe essere *FaMYB10* per la biosintesi delle antocianine. Come suggerito nei risultati, si può ipotizzare che l'intervento di *FaSHP* sia diretto su quei geni (*FaEG1* e *FaGalUR*) la cui espressione aumenta nei frutti sovra-espressanti *FaSHP*. A supporto di questa ipotesi sequenze di legame per fattori di trascrizione MADS-box (CArG-box) sono state identificate nel promotore di *FaEG1* (Spolaore *et al.*, 2003) e, grazie all'analisi bioinformatica del promotore di *FaGalUR* (paragrafo 3.2.20), simili sequenze sono state individuate anche in questo secondo promotore. Dal momento che il promotore di *FaMYB10* non è stato ad oggi pubblicato, l'analisi bioinformatica è stata condotta sul promotore dell'ortologo presente in *F. vesca* (*FvMYB10*), il cui profilo di espressione è confrontabile con quello di *FaMYB10* (Lin-Wang *et al.*, 2010). Anche in questo caso sono state identificate alcune putative sequenze CArG-box. Naturalmente l'identificazione di questi motivi nei promotori dei geni considerati non permette di escludere che tali geni possano essere regolati da altri fattori di trascrizione MADS-box.

Dal momento che in pomodoro vi è una relazione tra *TAGL1* ed il controllo ormonale da parte dell'etilene sulla maturazione, si è investigato se anche l'azione di *FaSHP* possa essere collegata alla regolazione ormonale di questo processo. Gli esperimenti di trattamento con ABA ed auxina, considerati i principali regolatori della maturazione in fragola, hanno messo in evidenza come l'espressione di *FaSHP* sia regolata positivamente

dal primo e negativamente dal secondo. Per approfondire questo aspetto relativo alla regolazione ormonale di *FaSHP* si è deciso di clonare il promotore del gene per verificare se vi siano degli elementi regolatori in *cis* associati ai due ormoni. E' stata dunque isolata una sequenza di circa 1600 bp a monte dell'ATG (paragrafo 3.2.12.3, allegato 5.3) che è stata in seguito sottoposta ad analisi bioinformatica. Come riportato in figura 4.1.14, tale analisi ha portato all'identificazione di un elemento di risposta all'ABA (ABRE), due elementi di risposta all'auxina (AuxRE e AuxRR) ed altri tre siti di legame per fattori di trascrizione implicati nelle risposte a quest'ultimo ormone (in arancione). Questi dati supportano la regolazione ormonale del gene ed insieme agli esperimenti di trattamento con ABA e auxina suggeriscono che in fragola il controllo ormonale intervenga a monte del *network* in cui è inserito *FaSHP*. Si può dunque ipotizzare che *FaSHP* possa fungere, almeno in parte, da mediatore nella regolazione da parte dei due ormoni. L'analisi del promotore di *FaSHP* ha messo in evidenza anche la presenza di due sequenze CARG-box le quali indicano una possibile regolazione del gene da parte di altri fattori di trascrizione MADS-box.

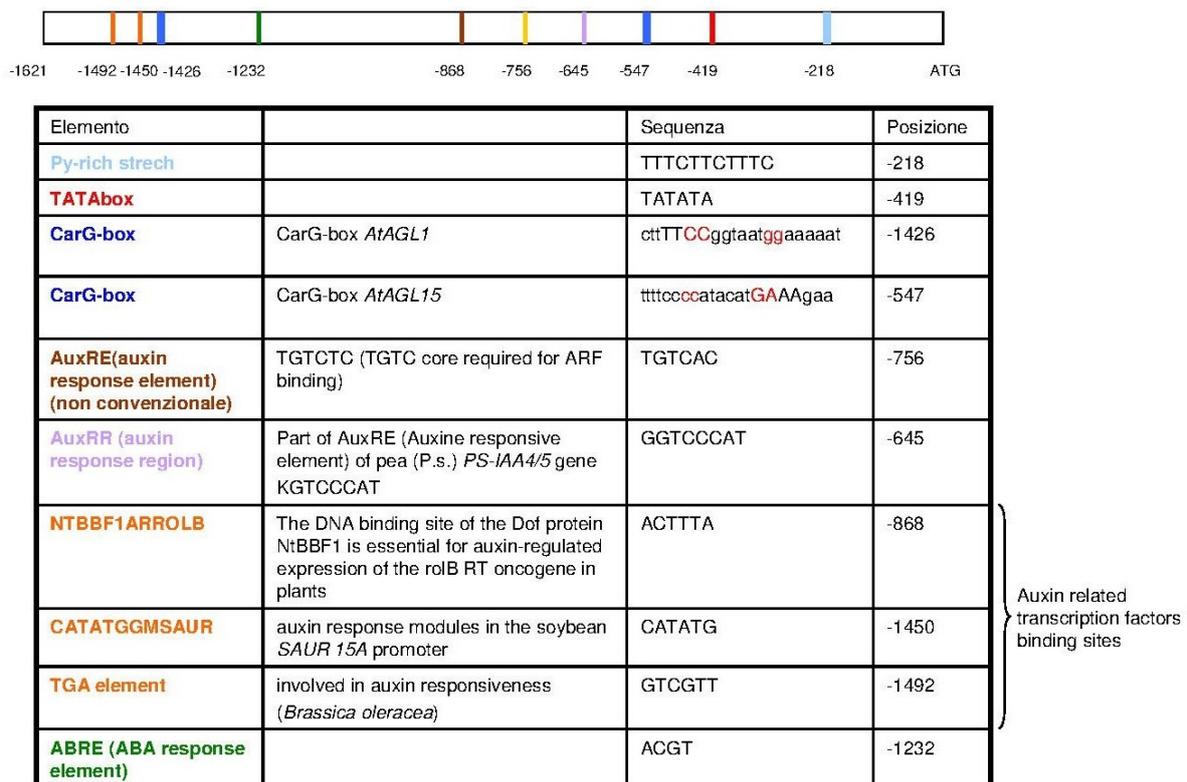


Figura 4.1.14: Analisi bioinformatica del promotore del gene *FaSHP*.

Concludendo, i dati ottenuti dallo studio del gene *FaSHP* depongono a favore di un suo ruolo in qualità di *master gene* nella regolazione della maturazione del frutto di fragola.

Inoltre, essi permettono di estendere il ruolo di regolazione della maturazione dei geni MADS-box di classe C dai "frutti botanici" (pomodoro e pesca) ad un falso frutto quale è la fragola. Dal momento che le strutture carnose associate ai semi delle Gimnosperme sono dei falsi frutti, e geni MADS-box di classe C sono espressi nella loro maturazione, si può ipotizzare che i geni MADS-box di classe C intervengano anche nella maturazione dei "frutti" delle Gimnosperme.

Per dare maggior robustezza ai dati di espressione ottenuti in questa parte del lavoro, stiamo ora collaborando con un gruppo di ricerca dell'Università degli Studi di Verona per affiancarvi un'analisi dei metaboliti presenti nei frutti sotto- e sovra-esprimenti *FaSHP*.

4.2 Analisi funzionale del gene *TM8* di *Solanum lycopersicum*

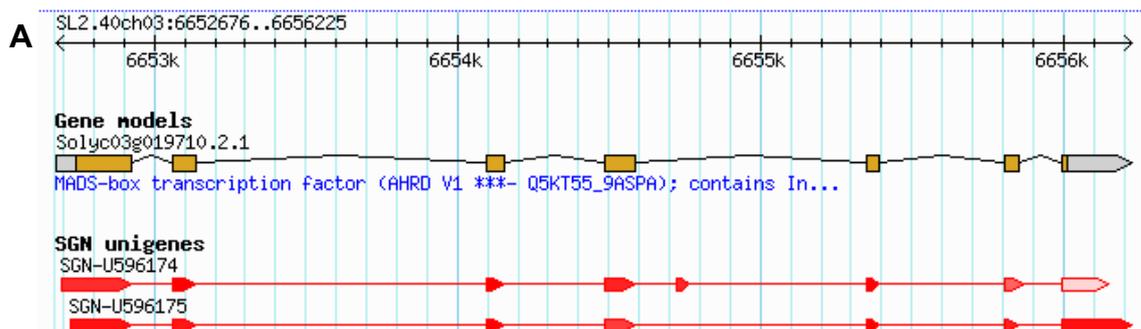
Il secondo gene su cui si focalizza il presente lavoro è il gene *TM8* (*Tomato MADS-box 8*) di pomodoro (Pnueli *et al.*, 1991), il primo gene ad essere stato isolato nell'ambito di un clade di geni MADS-box ad oggi poco studiati (Heijmans *et al.*, 2012). Due sono essenzialmente le motivazioni che hanno portato a considerare *TM8*. In primo luogo i geni *TM8-like* rappresentano una sottofamiglia di geni MADS-box molto antica, probabilmente un rappresentante di questo clade era già presente nel più recente antenato comune delle Spermatofite, vissuto circa 300 milioni di anni fa (Melzer *et al.*, 2010). Fattori di trascrizione *TM8-like* sono stati infatti identificati oltre che in varie Angiosperme (*Cucumis sativus*, *Vitis vinifera*, *Anthirrinum majus*, *Populus trichocarpa*) (Ando *et al.*, 2001; Diaz-Riquelme *et al.*, 2009; Heijmans *et al.*, 2012) anche in una specie collocata fra le Angiosperme basali (*Amborella trichopoda*) (Albert *et al.*, 2005) e in alcune Gimnosperme (*Ginkgo biloba*, *Criptomeria japonica*, *Taxus baccata*) (Futamura *et al.*, 2008; Lovisetto *et al.*, 2012). In secondo luogo il gene *TM8* di pomodoro ha un'espressione ubiquitaria nella pianta ed è espresso in modo particolare nel frutto, con un massimo nella fase di frutto giallo, indicando dunque un suo possibile ruolo durante lo sviluppo e/o maturazione di questa struttura (Hilemann *et al.*, 2006). Inoltre il mio gruppo di ricerca ha recentemente evidenziato come i trascritti dei geni *TM8-like* di *G. biloba* e di *T. baccata* abbiano una simile distribuzione ubiquitaria nei vari tessuti di queste due piante e siano presenti anche durante lo sviluppo e la maturazione delle strutture carnose associate ai loro semi (Lovisetto *et al.*, 2012). La similarità dei profili di espressione suggerisce che i geni *TM8-like*, oltre ad avere conservato la propria funzione durante la storia evolutiva delle Spermatofite, possano intervenire durante lo sviluppo delle strutture che facilitano la dispersione dei semi sia nelle Angiosperme che nelle Gimnosperme. Tuttavia, fino ad oggi nessun rappresentante di questa sottofamiglia genica è stato analizzato quindi, per spiegare le sue funzioni, questa parte del lavoro si propone di caratterizzare funzionalmente il gene *TM8* di pomodoro. Il pomodoro è un organismo modello e pertanto è un buon sistema sperimentale per condurre questa analisi funzionale.

4.2.1 Analisi della sequenza ed espressione del gene *TM8*

Il cDNA del gene *TM8* (X60760) di pomodoro è stato inizialmente isolato (Pnueli *et al.*, 1991) mediante lo *screening* di una libreria costruita da meristemi del mutante *anantha*, nel quale i meristemi che dovrebbero originare i fiori si sviluppano invece in germogli indeterminati che presentano una combinazione di caratteri vegetativi e tipici dell'infiorescenza (Lozano *et al.*, 2009). Il gene *TM8* è stato a lungo considerato un gene MADS-box anomalo in quanto non presente in *A. thaliana*, e per diversi anni è stato l'unico esponente noto della sottofamiglia *TM8*. Inoltre, la sequenza codificante risulta essere piuttosto breve (522 nucleotidi) e ciò è dovuto alla presenza di una regione codificante il dominio C-terminale estremamente ridotta (20 nucleotidi). Questa peculiarità determina la posizione basale di *TM8* nelle filogenesi dei geni MADS-box di tipo MIKC (Doyle, 1994; Purugganan *et al.*, 1995; Hilemann *et al.*, 2006).

Per poter condurre un'analisi funzionale di *TM8* si è reso necessario clonare il cDNA del gene e a tal fine è stata effettuata una RT-PCR (paragrafo 3.2.12.2) con oligonucleotidi specifici disegnati sulla sequenza X60760, usando come template cDNA di frutto breaker nel quale, secondo il lavoro di Hilemann *et al.* (2006), il gene dovrebbe essere al suo massimo di espressione. Andando ad analizzare la sequenza dell'amplificato è risultato che la regione codificante ottenuta presenta 60 nucleotidi in più rispetto alla sequenza X60760 (2 frammenti di 42 e 18 nucleotidi, localizzati rispettivamente nella regione codificante il dominio K ed il dominio C terminale). La sequenza è stata dunque allineata mediante il programma BLASTN sul genoma di pomodoro (<http://solgenomics.net>) e si è osservato che essa corrisponde al gene SGN_U596174, annotato nella stessa regione del genoma in cui è annotato il gene SGN_U596175 che corrisponde invece alla sequenza X60760 (figura 4.2.1 A).

Utilizzando il programma PFAM sull'ORF isolata è stato possibile identificare i domini proteici contenuti nella sequenza proteica predetta. In particolare il dominio MADS-box, costituito da 50 amminoacidi, si trova localizzato tra gli amminoacidi 9 e 59, mentre il dominio K è localizzato più a valle, tra i residui 74 e 172 (figura 4.2.1 B, allegato 5.2).



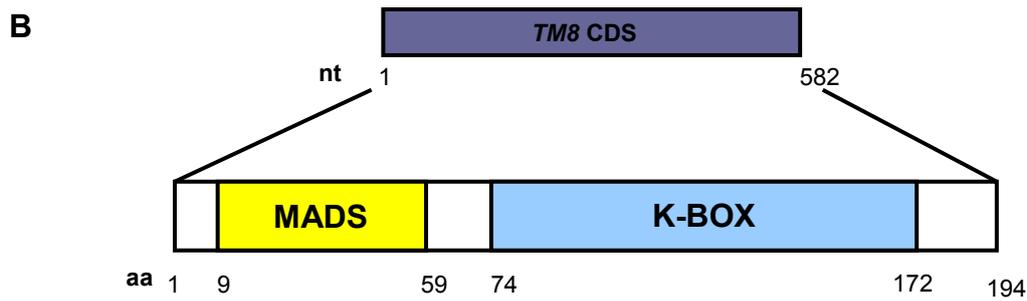


Figura 4.2.1: (A) Annotazione della regione del genoma di pomodoro in cui si localizza il gene *TM8*, (B) schema della sequenza proteica dedotta.

Per confermare l'appartenenza della sequenza isolata alla sottofamiglia *TM8* è stato costruito un albero filogenetico prendendo in considerazione le sequenze proteiche dedotte (domini M, I e K) di una serie di geni *TM8-like*, sia di Angiosperme che di Gimnosperme, insieme ad altre sequenze di geni MADS-box (paragrafo 3.2.21). L'albero filogenetico ottenuto (figura 4.2.2) mostra come la sequenza isolata trovi collocazione nel clade *TM8*, tra le sequenze delle specie appartenenti alle Angiosperme.

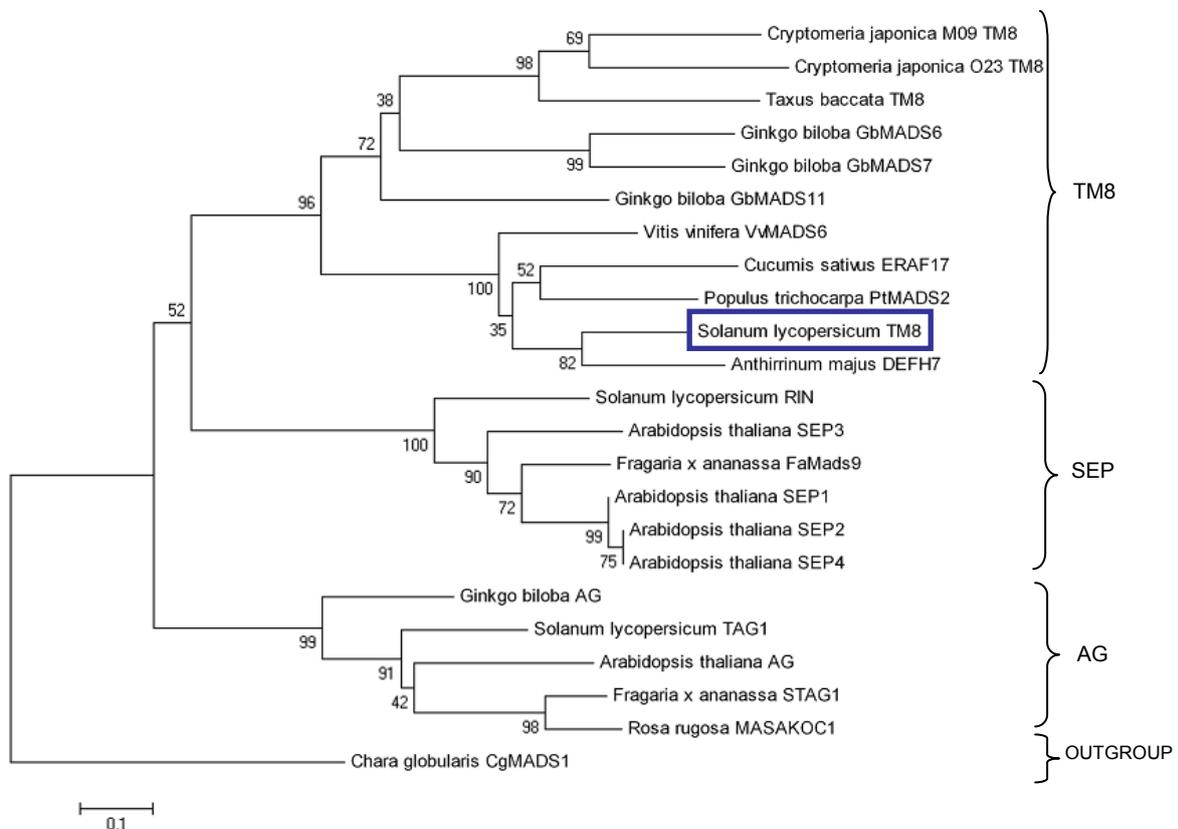


Figura 4.2.2: Albero filogenetico costruito utilizzando alcune sequenze tradotte di geni MADS-box di specie appartenenti sia alle Angiosperme che alle Gimnosperme, che mette in evidenza la collocazione di *TM8* nel clade *TM8*.

I primi lavori relativi a *TM8* presenti in letteratura mostrano che i trascritti di *TM8* si localizzano nel meristema dell'infiorescenza, nei primordi di antere e ovari e nei petali, stami e carpelli di fiori all'antesi (Pnueli *et al.*, 1991; Pitto *et al.*, 2001). I dati di espressione pubblicati successivamente da Hilemann *et al.* (2006) indicano come i trascritti del gene *TM8*, oltre a essere presenti nel fiore, si accumulino anche in tessuti vegetativi (radici, foglie) e nel frutto ai vari stadi di sviluppo (verde, breaker, giallo e rosso).

Dal momento che il cDNA isolato in questo lavoro mostra alcune differenze rispetto alla sequenza già pubblicata, si è ritenuto opportuno valutarne l'espressione mediante *real-time* PCR, utilizzando oligonucleotidi disegnati sulla regione della sequenza isolata che si differenzia dalla sequenza X60760. L'espressione è stata analizzata su cDNA retro-trascritto da RNA estratto da foglie, fiori all'antesi e frutti a diversi stadi di sviluppo (paragrafo 3.2.1).

Come si può osservare in figura 4.2.3 a il gene è espresso in tutti i tessuti considerati ma la sua espressione è particolarmente elevata nel fiore. Inoltre, anche in questo caso, è nei frutti allo stadio breaker che si trova il massimo di espressione nel corso della maturazione. L'espressione del gene nel fiore è stata poi analizzata in maggior dettaglio separando i diversi componenti floreali. I risultati ottenuti (figura 4.2.3 b) mostrano che *TM8* è espresso in modo particolare nei petali e negli stami.

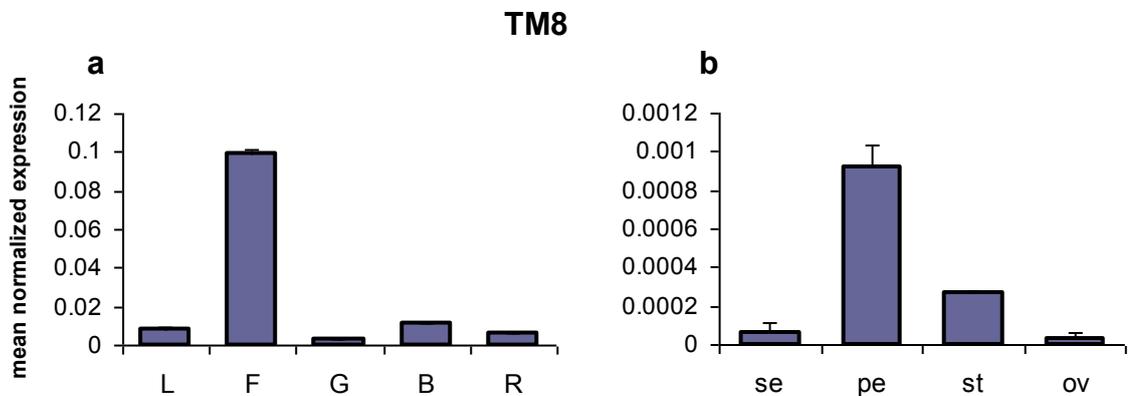


Figura 4.2.3: Profilo di espressione del gene *TM8* ottenuto mediante esperimenti di *real-time* PCR. L: foglia, F: fiore, G: frutto verde maturo, B: frutto breaker, R: frutto rosso, se: sepali, pe: petali, st: stami, ov: ovari. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard (D.S.) delle medie di tre repliche.

4.2.2 Trasformazione di pomodoro

Per cercare di far luce sulla possibile funzione del gene *TM8* si è pensato di ricorrere ad un approccio di *reverse genetics*. Si è pertanto deciso di produrre piante di pomodoro transgeniche che sovra-esprimono *TM8* e piante che sovra-esprimono invece il gene nella forma di repressore trascrizionale. In questo secondo caso è stata dunque adottata una strategia innovativa denominata CRES-T (*Chimeric REpressor gene Silencing Technology*), che permette di trasformare fattori trascrizionali in repressori mediante fusione con un dominio repressore. È stato dimostrato che i repressori così prodotti riescono a sopprimere in maniera specifica geni *target*, producendo un fenotipo del tutto simile ai mutanti *loss of function* del fattore di trascrizione di interesse (Hiratsu *et al.*, 2003); attualmente si ritiene che ciò sia reso possibile da un meccanismo di trans-repressione mediato dall'interazione tra proteine (Matsui *and* Ohme-Takagi, 2010). Questa strategia si è rivelata particolarmente utile nei casi di ridondanza funzionale del gene in esame, com'è frequente tra i geni MADS-box (Hiratsu *et al.*, 2003; Itkin *et al.*, 2009). Dal momento che nulla è noto in merito alla funzione di *TM8*, ed esso è particolarmente espresso nel fiore dove agiscono molti altri geni MADS-box, si è preferito l'impiego di questa strategia al classico silenziamento mediante *RNA interference*.

Per la sovra-espressione è stato allestito un vettore binario nel quale la regione codificante del gene è stata posta sotto il controllo del promotore CaMV 35S (pBINAr_TM8, paragrafo 3.2.12.2). Per la sovra-espressione del repressore, invece, il cDNA di *TM8* è stato clonato in frame con una breve sequenza codificante il peptide SRDX (LDLDLELRGFA, dominio repressore) e la chimera così ottenuta è stata posta sotto il controllo del promotore CaMV 35S, nello stesso plasmide impiegato per il costrutto precedente (pBINAr_TM8::SRDX, paragrafo 3.2.12.2). I costrutti così ottenuti sono stati introdotti in cellule di *Agrobacterium tumefaciens* (paragrafo 3.2.13) ceppo LBA4404. Successivamente si è proceduto alla trasformazione di pomodoro secondo il protocollo di infezione del materiale vegetale, rigenerazione e selezione dei trasformanti proposto da Cirillo *et al.* (1997) ed opportunamente modificato per la cultivar (*Florida petite*) impiegata negli esperimenti (paragrafo 3.2.15).

Dopo tre serie di trasformazioni di 100 cotiledoni con ciascuno dei due costrutti, si sono ottenuti 22 e 15 cloni indipendenti resistenti alla kanamicina, trasformati rispettivamente con il costrutto per la sovra-espressione e con la chimera *TM8*::SRDX. L'avvenuta trasformazione è stata verificata mediante PCR sul DNA genomico estratto dalle foglie dei cloni ottenuti. Per ciascun clone due copie sono state mantenute in sterilità ed almeno una è stata posta in terra e messa a crescere in serra.

4.2.2.1 Caratterizzazione fenotipica delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8 (35S::TM8)

Le piante trasformate con il costrutto pBINAr_TM8 mostrano alterazioni fenotipiche unicamente a carico del fiore. Il fiore di pomodoro è costituito da quattro verticilli formati dall'esterno verso l'interno da un numero medio di 6 sepali fogliacei completamente separati tra di loro, 6 petali di colore giallo intenso che si alternano ai sepali, 6 stami costituiti da filamenti molto corti alla cui estremità si localizzano le antere che formano una sorta di struttura tubulare attorno allo stilo grazie all'intreccio di numerosi peli presenti ai lati delle antere stesse (figura 4.2.4 A, D). Il verticillo più interno (gineceo) è costituito da due o più carpelli fusi che danno origine ad un ovario sulla cui parte distale si localizza lo stilo che termina con lo stigma.

Nei trasformanti le alterazioni interessano in maniera evidente il terzo verticillo dove gli stami risultano essere frequentemente dialitici (figura 4.2.4 E), ovvero le antere sono in parte separate anziché essere unite a formare il cono staminale. Nei casi più estremi alcune antere del fiore risultano di ridotte dimensioni e presentano una colorazione giallo-verde (figura 4.2.4 B). Assai più frequentemente si osserva solo una separazione parziale che interessa la parte più basale dell'antera (figura 4.2.4 C).

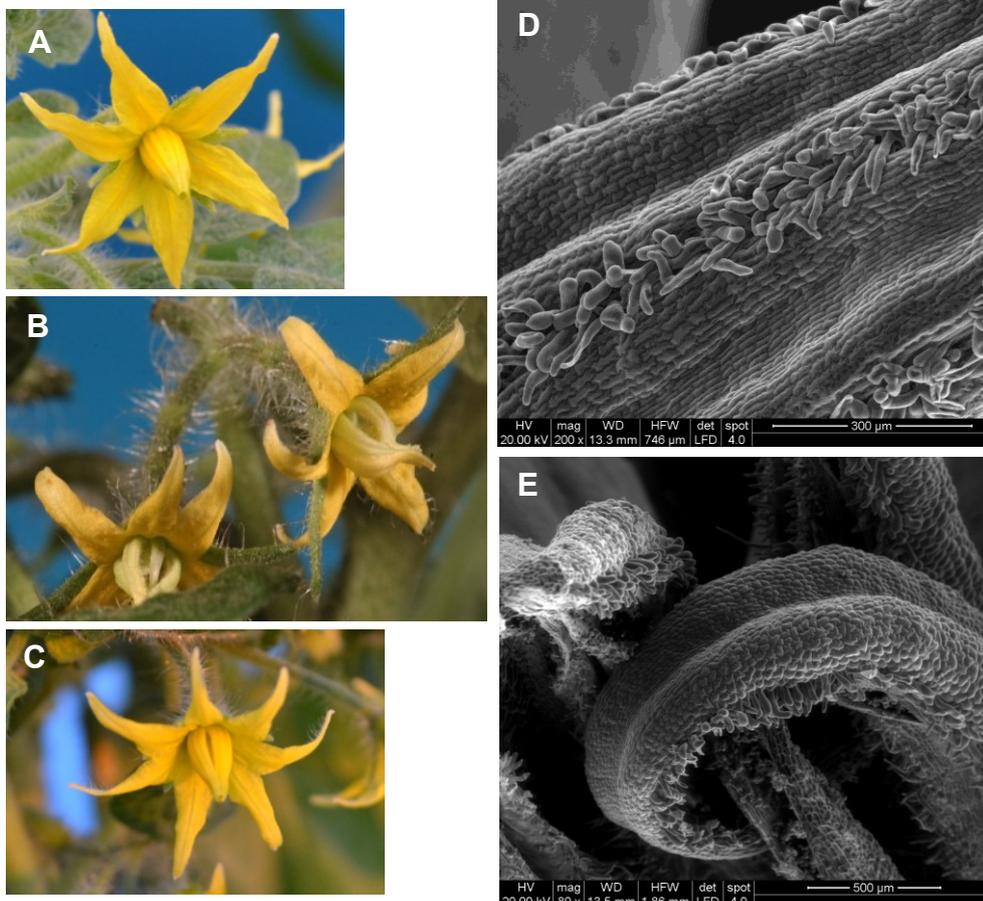


Figura 4.2.4: Fiori di pomodoro *wild-type* (A) e dei trasformanti 35S::*TM8*#16 (B), 35S::*TM8*#11B (C), caratterizzati dalla presenza di stami dialitici. (D) Foto al microscopio ESEM del cono staminale di un fiore *wild-type*, dove è evidente l'intreccio tra i peli laterali di antere adiacenti. (E) Foto al microscopio ESEM del cono staminale di un fiore del trasformante 35S::*TM8*#16, si nota l'antera ripiegata su se stessa.

Considerando che il fiore è l'organo in cui *TM8* è maggiormente espresso, si è deciso di approfondire il fenotipo osservato ed in prima istanza è stato utilizzato un saggio di vitalità cellulare [MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) *assay*, paragrafo 3.2.18] per testare se il polline prodotto dalle antere anomale sia vitale. A questo proposito, vengono considerati vitali i granuli pollinici che si colorano di viola - rosa intenso (figura 4.2.5 A). I risultati di questo test, riportati nella tabella di figura 4.2.5 B, hanno messo in evidenza come in tutte e tre le linee analizzate vi sia una consistente riduzione di vitalità del polline, che risulta particolarmente marcata nella linea che presenta il fenotipo più forte (35S::*TM8*#16). Tale riduzione di vitalità si rispecchia anche nel numero di semi prodotti. La linea con fenotipo più forte presenta infatti solo frutti partenocarpici, mentre le altre due producono frutti con semi, che risultano però essere in numero esiguo rispetto a quelli presenti nei frutti prodotti dal *wild-type* (figura 4.2.5 B).

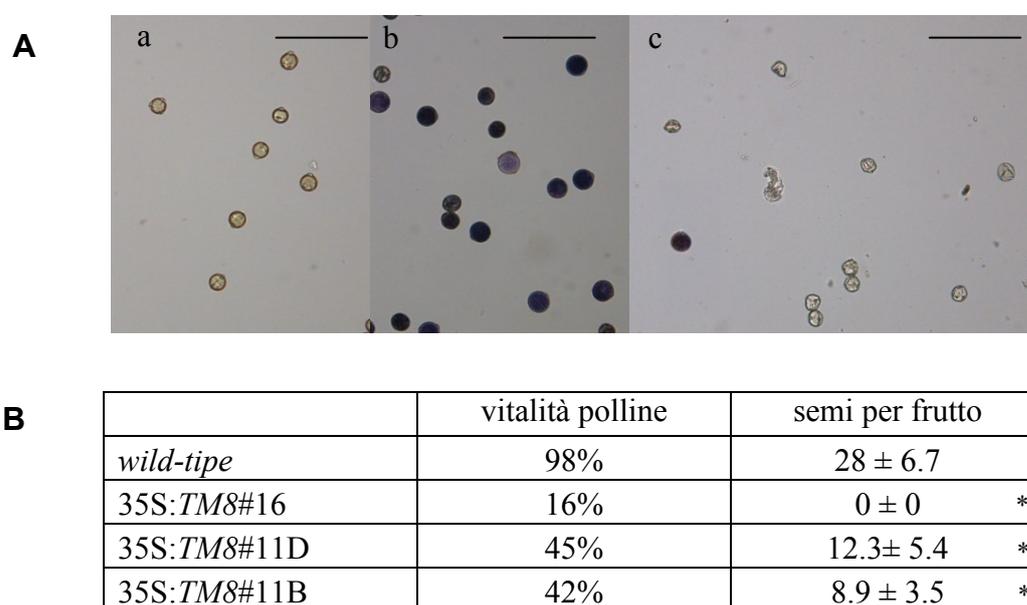


Figura 4.2.5: (A) Saggio di vitalità del polline (MTT *assay*): (a) granuli pollinici di fiori *wild-type* dopo esposizione ad 80 °C per 2 ore, (b) granuli pollinici di fiori *wild-type*, (c) granuli pollinici di fiori del trasformante 35S::*TM8*#16. Barre dimensionali: 50 µm. (B) vitalità del polline testata mediante saggio colorimetrico e numero medio ± D.S. (misure effettuate su 8 frutti) di semi prodotti per frutto nel *wild-type* e nelle tre piante considerate aventi stami dialitici. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la casella indicata e la corrispondente del wt ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

4.2.2.2 Caratterizzazione molecolare delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8 (35S::TM8)

Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di investigare a livello molecolare il fenotipo osservato. L'attenzione è stata focalizzata sui trasformanti caratterizzate da fenotipo forte che, come messo in evidenza in figura 4.2.6, presentano un livello di espressione del gene *TM8* assai superiore rispetto al *wild-type*, in modo particolare nei petali e negli stami.

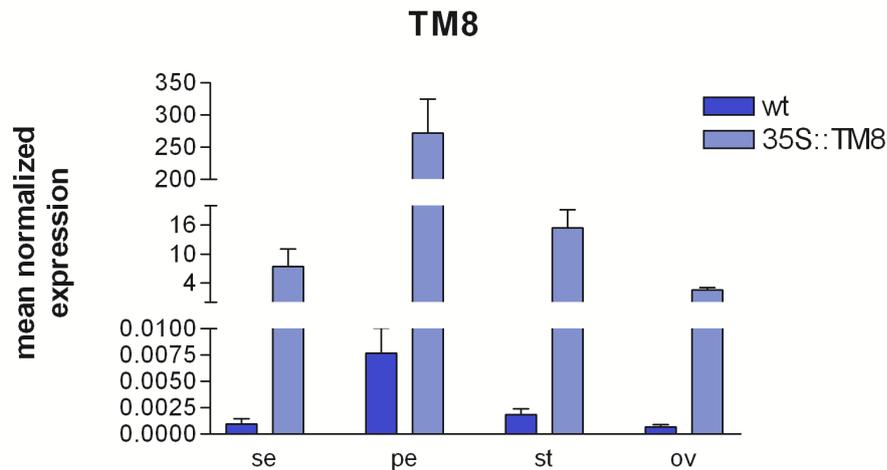


Figura 4.2.6: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, del gene *TM8* nei sepali (se), petali (pt), stami (st) ed ovari (ov) dei fiori con stami dialitici (35S::TM8) e dei fiori *wild-type* (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici.

Dal momento che i fattori di trascrizione MADS-box agiscono nella forma di complessi multimerici (dimeri e tetrameri), è plausibile pensare che la formazione di stami dialitici possa essere dovuta alla non corretta formazione dei complessi che intervengono nella formazione dell'androceo. Secondo il "modello ABC" dello sviluppo florale (paragrafo 1.1.5) l'identità del terzo verticillo florale è controllata dalla combinazione dei geni di classe B e C. In accordo con tale modello, l'eventuale alterata espressione dei geni di classe B e dei geni di classe C di pomodoro determina conversioni omeotiche a carico degli stami (paragrafo 1.3.2). Per verificare se la sovra-espressione di *TM8* possa aver interferito con l'accumulo dei trascritti dei geni di queste due classi, l'espressione degli stessi è stata analizzata negli stami dialitici. Tale analisi (figura 4.2.7) ha messo in evidenza come sia i geni di classe B (*TM6*, *TAP3*, *SIGLO1*, *SIGLO2*) che i geni di classe C (*TAG1*, *TAGL1*) risultino essere sotto-espressi negli stami dialitici 35S::TM8. Ciò è particolarmente interessante se si considera che in precedenti lavori il silenziamento del gene di classe C *TAG1* e di tutti i geni di classe B ha determinato, negli stami delle linee con fenotipo più blando, dei fenotipi (stami dialitici, riduzione della vitalità del polline) simili a quelli

osservati nel caso della sovra-espressione di *TM8* (Pan *et al.*, 2010; De Martino *et al.*, 2006; Geuten *and* Irish, 2010).

Alla luce della riduzione di espressione osservata per i geni di classe C e B, e considerato che questi geni intervengono anche nel definire l'identità dei carpelli (geni di classe C) e dei petali (geni di classe B), si è deciso di valutare l'espressione degli stessi anche negli altri verticilli in cui agiscono. Come si può osservare in figura 4.2.7, per i geni di classe C non vi sono importanti variazioni di espressione negli ovari 35S::*TM8* rispetto ai controlli, mentre nel caso dei geni di classe B vi è un aumento di espressione nei petali. La sovra-espressione di *TM8* non sembra dunque avere avuto effetti sui geni che controllano il verticillo centrale, mentre più interessante appare la risposta dei geni di classe B dato che alla loro riduzione di espressione negli stami si accompagna invece un aumentata espressione nei petali.

Considerata l'alterata espressione dei geni di classe B anche nei petali dei fiori con stami dialitici, si è deciso di completare la caratterizzazione molecolare andando infine ad analizzare l'espressione di *MC*, gene MADS-box di classe A di pomodoro (paragrafo 1.3.2). Come messo in evidenza in figura 4.2.7 l'espressione di *MC* aumenta sia nei petali che nei sepali dei fiori 35S::*TM8* rispetto ai controlli.

Sebbene a livello macroscopico la sovra-espressione del gene *TM8* determini alterazioni morfologiche significative unicamente a carico degli stami, l'analisi molecolare ha messo in evidenza una perturbazione dell'espressione dei geni MADS-box che solitamente agiscono, oltre che negli stami, anche nei sepali e nei petali. I geni MADS-box che variano di espressione come conseguenza della sovra-espressione di *TM8* potrebbero essere quelli insieme ai quali *TM8* esplica la propria funzione. E' infatti plausibile pensare che l'alterata espressione del gene interferisca con la formazione dei complessi regolatori in cui tale fattore di trascrizione è normalmente coinvolto. I dati ottenuti inducono dunque ad ipotizzare che *TM8* possa intervenire nella formazione dei complessi proteici che controllano la formazione dei tre verticilli florali più esterni, ciò è supportato in modo particolare per gli stami a livello dei quali si osservano anche effetti macroscopici sul fenotipo.

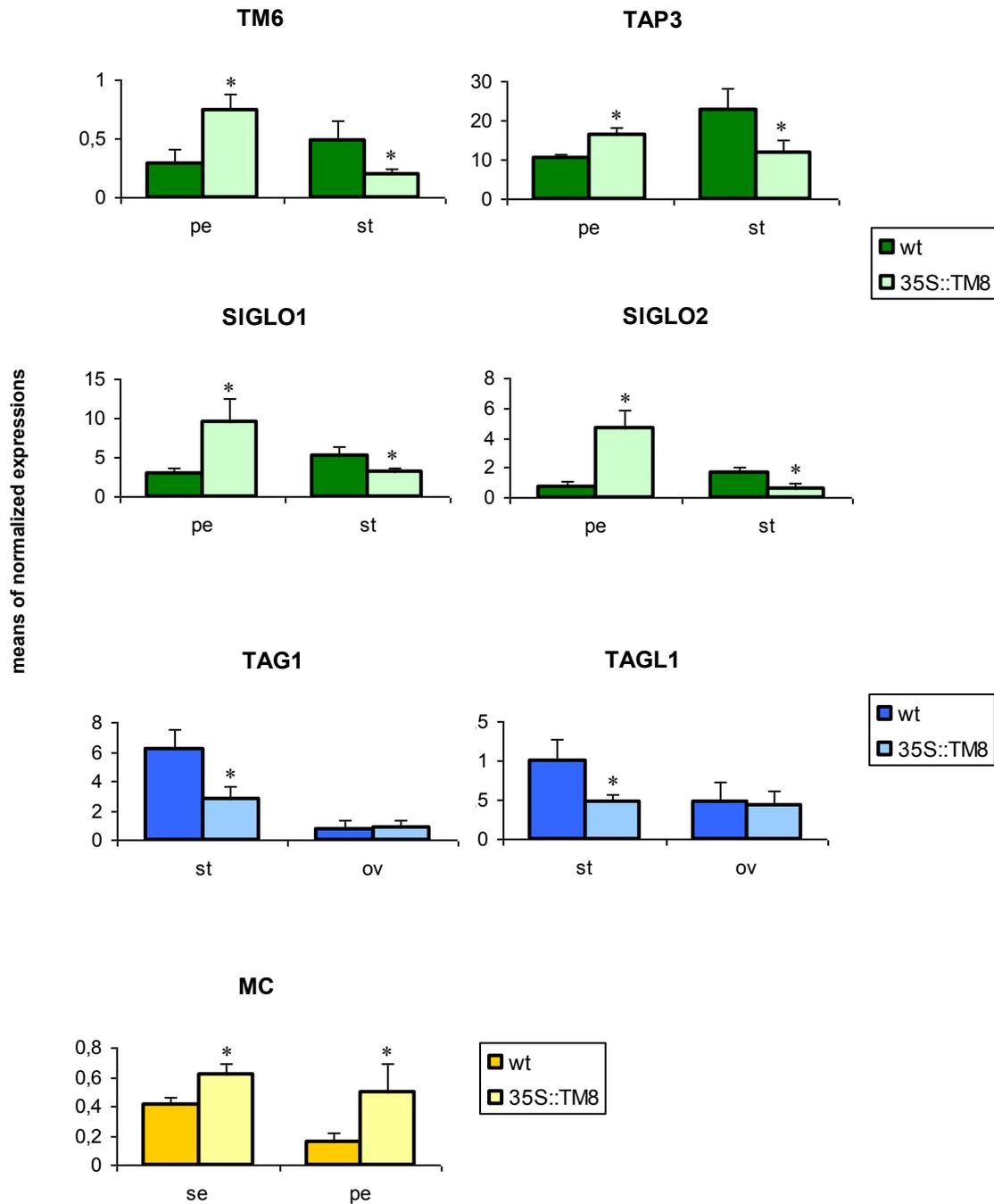


Figura 4.2.7: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, dei geni MADS-box di classe B (*TM6*, *TAP3*, *SIGLO1*, *SIGLO2*), di classe C (*TAG1*, *TAGL1*) e di classe A (*MC*) nei sepali (se), petali (pt), stami (st) ed ovari (ov) dei fiori con stami dialitici (35S::TM8) e dei fiori *wild-type* (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna dei trasformanti e quella relativa al wt ($P < 0.05$, t-test).

4.2.2.3 Caratterizzazione fenotipica delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_{TM8::SRDX} (35S::TM8::SRDX)

A differenza delle piante sovra-esprimenti *TM8*, le piante trasformate con il costrutto pBINAr_{TM8::SRDX} mostrano alterazioni fenotipiche, rispetto al *wild-type*, oltre che nei tessuti riproduttivi anche in quelli vegetativi. Il fenotipo più evidente in questi ultimi è una marcata epinastia fogliare (figura 4.2.8 A). Fin dagli stadi giovanili si osserva infatti un'anormale modificazione dell'angolo di inserzione dei piccioli fogliari sui rami, con conseguente portamento verso il basso delle lamine fogliari. Le foglie non mostrano evidenti alterazioni morfologiche anche se, come si può notare in figura 4.2.8 A, esse presentano una colorazione verde molto più intensa rispetto alle foglie del *wild-type*. Per capire se quest'ultima variazione possa essere dovuta ad una modifica nel contenuto di pigmenti clorofilliani è stato analizzato il loro contenuto in foglie transgeniche e *wild-type* (paragrafo 3.2.19). Come si può osservare in figura 4.2.8 B, le tre linee considerate per l'analisi mostrano una concentrazione di clorofilla a e clorofilla b significativamente superiore rispetto al selvatico, il rapporto 3:1 tra i due tipi di clorofille è comunque mantenuto nei trasformanti.

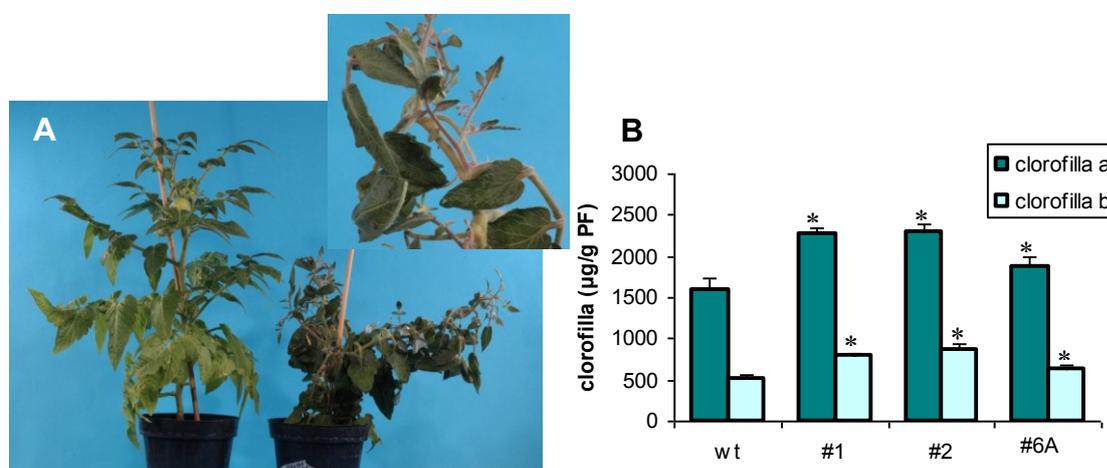


Figura 4.2.8: (A) pianta wt (a sinistra) e trasformata con il costrutto pBINAr_{TM8::SRDX}, linea 35S::TM8::SRDX#2 (a destra), caratterizzata da una forte epinastia fogliare (vedi inserto). (B) contenuto dei pigmenti clorofilla a e clorofilla b ($\mu\text{g/g PF}^{-1}$) estratti con dietiletere dalle foglie delle linee 35S::TM8::SRDX#1, #2, #6A e del *wild-type*. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna indicata e la corrispondente del wt ($P < 0.05$, t-test, mann whitney test).

Le altre alterazioni fenotipiche presenti nei trasformanti 35S::*TM8*::SRDX interessano le strutture riproduttive. Particolarmente evidente è l'anomala morfologia dei peduncoli dei fiori e dei frutti. Questi risultano infatti molto più allungati (figura 4.2.9 B) rispetto a quelli delle piante *wild-type* (figura 4.2.9 A) e frequentemente formano delle strutture curve (figura 4.2.9 C). Anche le zone di abscissione di tali peduncoli sono malformate, il rigonfiamento che normalmente si nota in prossimità di queste strutture, e che nel *wild-type* risulta essere evidente già nei fiori all'antesi (figura 4.2.9 D), è infatti molto meno pronunciato e più allungato nei trasformanti (figura 4.2.9 E). Andando ad osservare tali regioni al microscopio ESEM, si osserva come gli strati di piccole cellule, che si localizzano nella zona di abscissione in corrispondenza del restringimento dell'epidermide (figura 4.2.9 F), siano disorganizzate nei peduncoli dei trasformanti (figura 4.2.9 G).

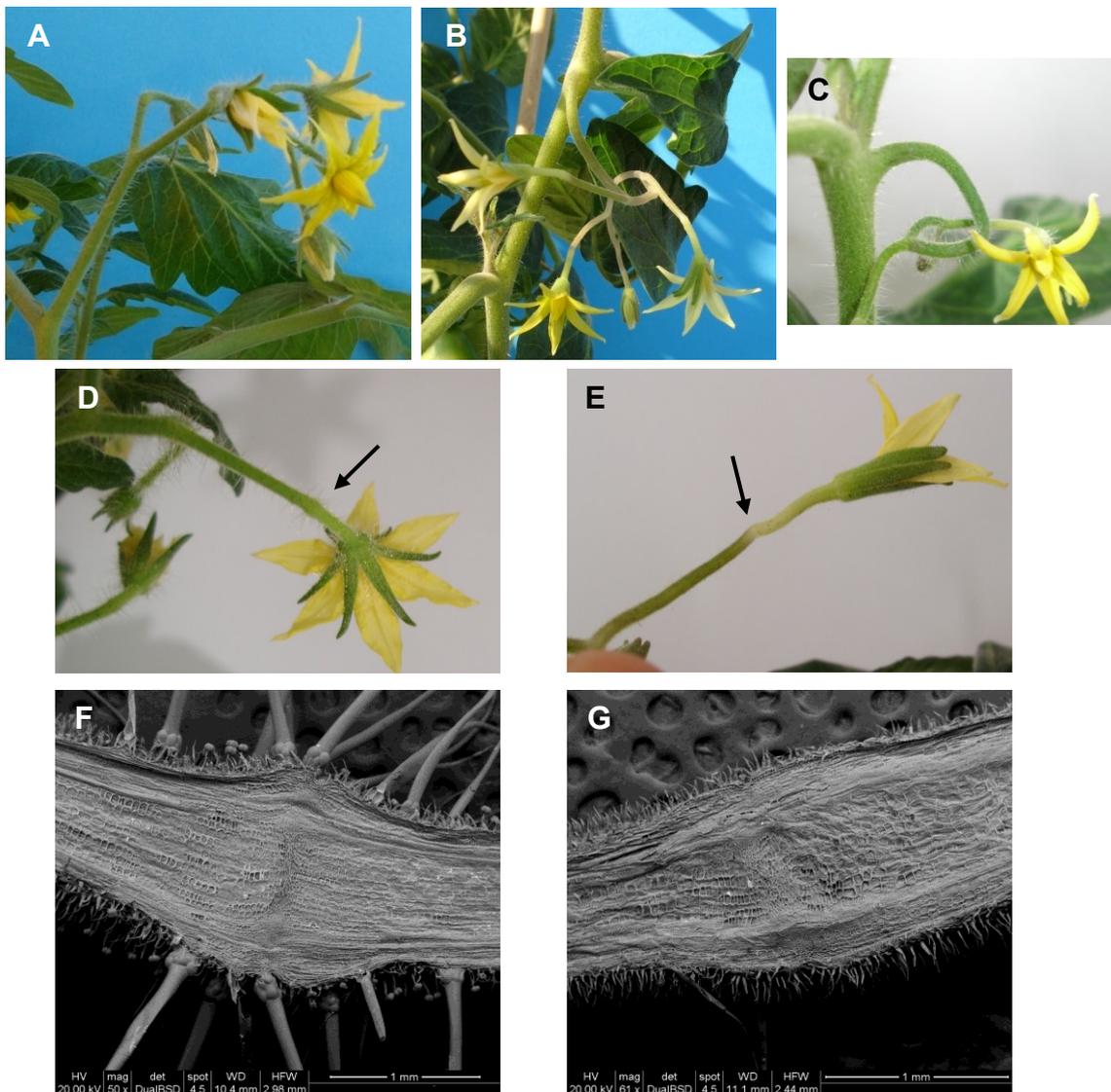


Figura 4.2.9: Infiorescenza di pianta *wild-type* (A) e della linea 35S::*TM8*::SRDX#2 (B); peduncolo fiorale arricciato del trasformatante 35S::*TM8*::SRDX#6A (C). Fiore *wild-type* (D) e del trasformatante 35S::*TM8*::SRDX#2 (E) all'antesi; le frecce indicano le zone di abscissione, rispettive foto al microscopio ESEM (F) e (G).

TM8 ha la sua espressione più alta nei fiori e le piante sovra-esprimenti il gene presentano alterazioni fenotipiche unicamente a carico del fiore. Anche nel caso delle piante trasformate con la chimera 35S::*TM8*::SRDX i fiori mostrano delle anomalie, seppure di tipo diverso rispetto a quanto visto nelle piante sovra-esprimenti *TM8*. Come si può osservare nelle figure 4.2.10 A e B, questi fiori sono caratterizzati da sepalari distribuiti in modo asimmetrico e che anche dopo l'antesi rimangono parzialmente uniti nella parte basale. Successivamente, gli elementi del calice si separano a causa della forza meccanica esercitata dall'accrescimento del frutto .

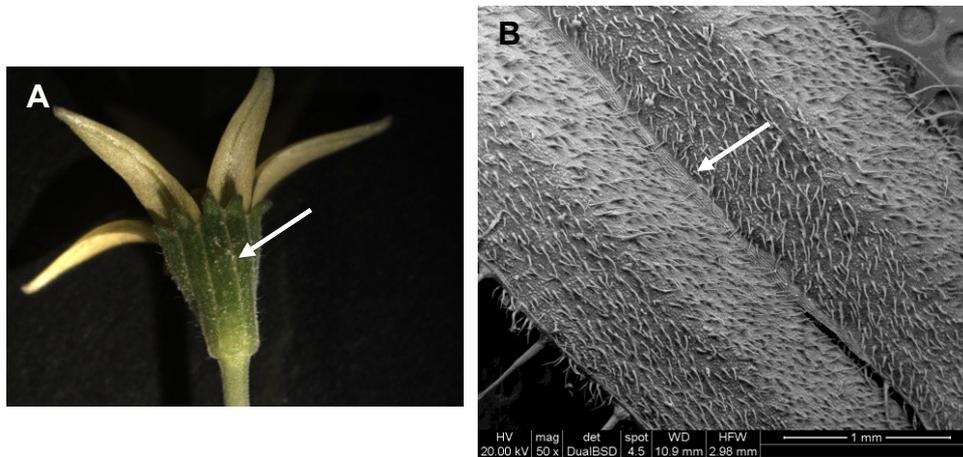


Figura 4.2.10: (A) Fiore del trasformatante 35S::*TM8*::SRDX#2, si notano gli elementi del calice uniti (freccia bianca). (B) Foto al microscopio ESEM di due sepalari del trasformatante 35S::*TM8*::SRDX#2 tenuti insieme da pochi strati di piccole cellule (freccia bianca).

Andando a sezionare longitudinalmente i fiori 35S::*TM8*::SRDX si osserva come essi presentino ovari di forma allungata (figura 4.2.11 B) rispetto a quelli dei fiori selvatici (figura 4.2.11 A). Questa caratteristica anatomica viene in seguito mantenuta anche durante la crescita del frutto. A differenza dei pomodori *wild-type* di forma tondeggiante nella cultivar impiegata per gli esperimenti (figura 4.2.11 C, D, F), i frutti 35S::*TM8*::SRDX hanno infatti forma allungata, come si può osservare sia nei frutti a dieci giorni dopo l'antesi (figura 4.2.11 C) che nei successivi stadi di sviluppo (figura 4.2.11 E, G).

Per quanto concerne la maturazione di questi frutti, andando a contare il numero di giorni che intercorre tra la comparsa dei primi segni di pigmentazione e lo stadio di frutto rosso, si osserva un lieve aumento nei frutti dei trasformatanti rispetto ai frutti del *wild-type* (*wild-*

type: $7,3 \pm 0,8$ giorni; 35S::*TM8*::SRDX#1: $9,6 \pm 1,4$ giorni; 35S::*TM8*::SRDX#2: $9,9 \pm 1,2$ giorni; 35S::*TM8*::SRDX#6A: $10,3 \pm 0,9$ giorni. $P < 0.05$, t-test, mann whitney test) che suggerisce una leggera dilatazione dei tempi di maturazione. Inoltre, i frutti prodotti da queste linee sono partenocarpici (figura 4.2.11 I).

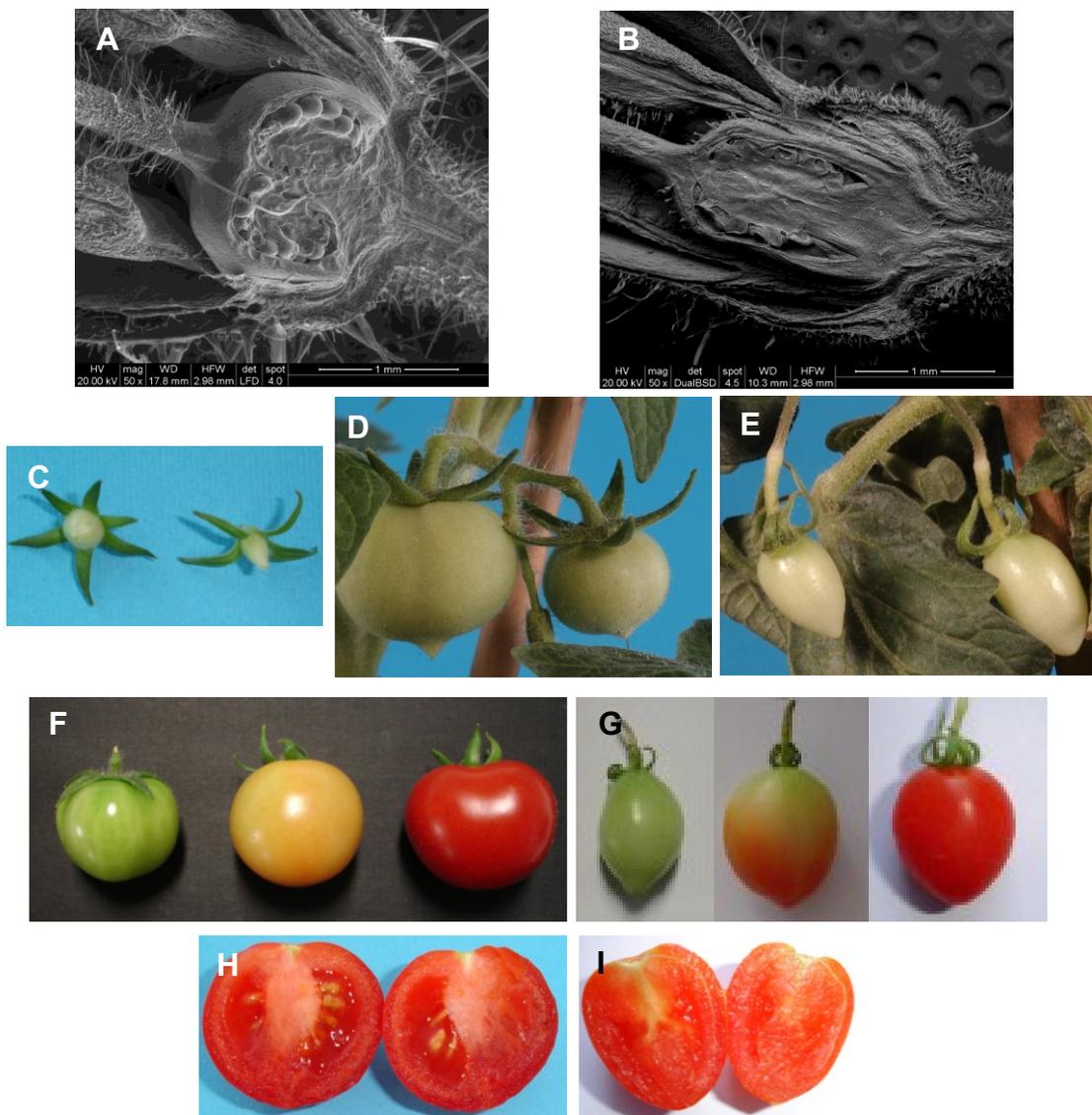


Figura 4.2.11: Foto al microscopio ESEM degli ovari in sezioni longitudinali di un fiore di pomodoro *wild-type* (A) e di un fiore del trasformato 35S::*TM8*::SRDX#2 (B). (C) Frutto di pomodoro *wild-type* (sinistra) e del trasformato 35S::*TM8*::SRDX#2 (destra) 10 giorni dopo l'antesi. Frutti di pomodoro *wild-type* (D, F) e del trasformato 35S::*TM8*::SRDX#2 (E, G) agli stadi di sviluppo verde, breaker e rosso. Sezione longitudinale di frutto di pomodoro allo stadio rosso che evidenzia la presenza dei semi nel *wild-type* (H) e la completa assenza di semi nel trasformato 35S::*TM8*::SRDX#2 (I).

Anche la sovra-espressione di *TM8* ha portato alla produzione di frutti partenocarpici, ed in questo caso l'assenza di semi è stata correlata alla ridotta vitalità del polline. Sebbene i

trasformanti 35S::TM8::SRDX non mostrino alterazioni morfologiche evidenti a carico degli stami, è stata testata la vitalità del polline mediante MTT assay (paragrafo 3.2.18) nelle linee 35S::TM8::SRDX che producono frutti partenocarpici. L'analisi non ha evidenziato alterazioni nella vitalità del polline (*wild-type*: 98%; 35S::TM8::SRDX#2: 97%, 35S::TM8::SRDX#2: 96%; 35S::TM8::SRDX#6A: 97%). L'assenza dei semi osservata nei trasformanti potrebbe allora essere imputata ad una alterata funzionalità degli ovuli e/o a qualche tipo di de-regolazione ormonale, è noto infatti che i fitormoni auxina, citochinine e giberelline intervengono nella formazione dei semi (Ruan *et al.*, 2012). Anche altre alterazioni fenotipiche delle piante trasformate con la chimera 35S::TM8::SRDX sono indicative di un qualche tipo di disfunzione ormonale. Ad esempio la marcata epinastia fogliare è una risposta fisiologica usualmente correlata all'etilene e simili fenotipi sono caratteristici di piante che presentano una sovra-produzione di questo ormone, quale è il caso del mutante *epinastic* (Barry *et al.*, 2001). La stessa curvatura dei peduncoli fiorali potrebbe essere una risposta correlata all'etilene, essa ricorda infatti l'esagerata curvatura degli uncini apicali negli ipocotili esposti ad elevate concentrazioni di etilene (Taiz *and* Zeiger, 2006). Per cercare di capire se i trasformanti prodotti presentino una sovra-produzione di etilene si è cercato di misurare la concentrazione di questo fitormone mediante gas-cromatografia dalle foglie. Purtroppo tale indagine non ha permesso di rilevare l'ormone, forse a causa della ridotta sensibilità dello strumento impiegato per l'analisi. Potrebbe anche essere che l'aumento di produzione di etilene nelle linee trasformate non sia così elevato oppure che vi siano altre spiegazioni ai fenotipi osservati. L'allungamento dei peduncoli fiorali e l'arricciatura degli stessi potrebbe, ad esempio, essere una risposta correlata anche ad una non corretta localizzazione dei gradienti di auxina. Quest'ultimo ormone è noto infatti per essere coinvolto nell'allungamento cellulare ed in vari tipi di tropismi (Taiz *and* Zeiger, 2006). Inoltre, negli ultimi anni è stato messo in evidenza l'esistenza di un intenso *cross-talk* etilene-auxina durante lo sviluppo della pianta. Come suggerito da Lin *et al.*, (2009) spesso risposte fisiologiche attribuite all'etilene nascondono modifiche nel trasporto di auxina.

Per cercare di far luce su questi aspetti e per meglio caratterizzare anche gli altri fenotipi osservati si è deciso di ricorrere anche in questo caso ad un approccio di tipo molecolare.

4.2.2.4 Caratterizzazione molecolare delle piante ingegnerizzate con il costrutto pBINAr_TM8::SRDX (35S::TM8::SRDX)

Per le analisi molecolari si è deciso di focalizzare l'attenzione sulle linee utilizzate nel precedente paragrafo per la descrizione delle alterazioni fenotipiche osservate. Come atteso (figura 4.2.12), in tutti i tessuti considerati vi è espressione della chimera *TM8::SRDX* che risulta essere invece assente nel *wild-type*.

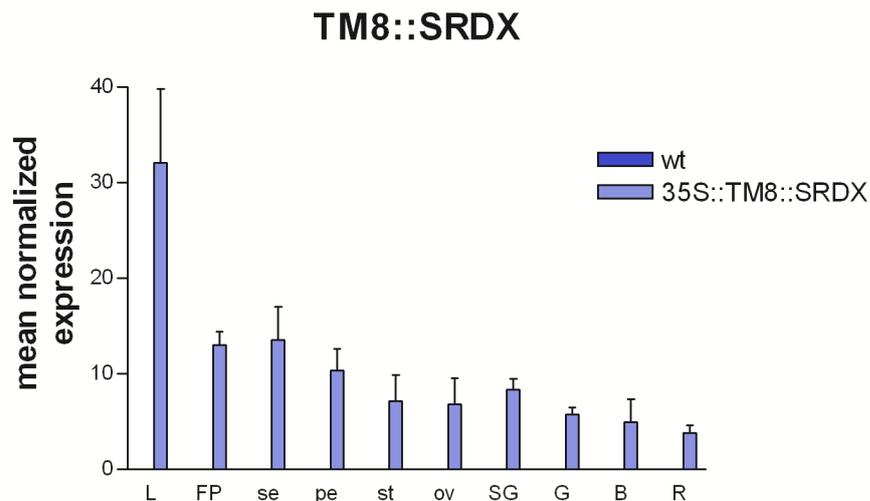


Figura 4.2.12: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, della chimera *TM8::SRDX* nelle foglie (L), peduncoli fiorali (FP), sepal (se), petali (pt), stami (st), ovari (ov) frutti a 10 giorni dopo l'antesi (SG), frutti verde maturo (G), frutti breaker (B) e frutti rossi (R) dei trasformanti 35S::TM8::SRDX e del *wild-type* (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici.

Per interpretare le analisi molecolari condotte è bene ricordare che, come descritto nel paragrafo 4.2.2, il dominio SRDX fuso al fattore di trascrizione TM8 agisce come repressore e può quindi alterare l'attività dei complessi regolatori in cui TM8 è coinvolto. Ci si attende dunque di osservare variazioni di espressione nei geni *target* di tali complessi trascrizionali, tuttavia si potrebbero osservare variazioni anche nei trascritti di quei fattori che interagiscono fisicamente con TM8 in seguito all'attivazione di possibili meccanismi di controllo a *feed-back*.

Poiché le misurazioni dell'etilene non hanno dato risultato, si è pensato di analizzare l'espressione di un gene codificante un enzima implicato nella biosintesi di questo fitormone (paragrafo 1.1.3). La scelta è ricaduta su *ACO1* che viene espresso nelle foglie di pomodoro (Barry *et al.*, 1996). Come si può osservare in figura 4.2.13, l'analisi condotta su foglie adulte evidenzia un aumento dei trascritti di questo gene nei trasformanti rispetto al selvatico. Sarà necessario analizzare l'espressione anche di altri geni coinvolti nella sintesi

di etilene per capire se vi possa essere effettivamente un'aumentata produzione di tale ormone nei trasformanti 35S::TM8::SRDX. Il risultato ottenuto è comunque particolarmente rilevante se si considera che l'espressione dei geni *ACO* è sottoposta a stretta regolazione durante lo sviluppo, anche ad opera del fitormone auxina (Lin *et al.*, 2009) e l'epinastia fogliare è una risposta fisiologica che è stata associata oltre che all'etilene, anche all'auxina (Lin *et al.*, 2008a). Come suggerito nel paragrafo 4.2.2.3 altre alterazioni fenotipiche osservate possono essere messe in relazione all'auxina. Si è pertanto pensato di investigare l'espressione di alcuni geni *Aux/IAA* che codificano per regolatori trascrizionali implicati nella via di trasduzione del segnale di questo ormone.

Il primo di questi geni ad essere considerato è *SIIAA3*, un gene la cui espressione è sia auxina che etilene dipendente e che agisce oltre che nella via di trasduzione del segnale dell'auxina anche in quella dell'etilene (Chaabouni *et al.*, 2003). Come riportato in figura 4.2.13, in seguito alla sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX* si osserva un'aumentata espressione di questo gene nelle foglie epinastiche ed una riduzione di espressione dello stesso nei peduncoli fiorali allungati e curvati. Considerando che il silenziamento di *SIIAA3* riduce la risposta di curvatura epinastica delle foglie all'etilene e produce un'aumentata curvatura nell'uncino apicale (Chaabouni *et al.*, 2003), si può ipotizzare che le variazioni dei trascritti di questo gene osservate nei tessuti considerati possano contribuire alle alterazioni fenotipiche rilevate nei trasformanti 35S::TM8::SRDX. Il secondo gene *Aux/IAA* sul quale è stata focalizzata l'attenzione è il gene *SIIAA27* che è stato di recente caratterizzato (Bassa *et al.*, 2012). Questo gene ha attratto la nostra attenzione dal momento che il suo silenziamento determina la produzione di frutti con forma allungata del tutto simile a quella dei pomodori 35S::TM8::SRDX. Inoltre il suo silenziamento porta anche ad una riduzione del contenuto di clorofilla nelle foglie in modo diametralmente opposto a quanto osservato per le foglie 35S::TM8::SRDX (Bassa *et al.*, 2012). Andando ad analizzare l'espressione di questo gene nelle foglie epinastiche si osserva un consistente aumento dei suoi trascritti mentre gli stessi risultano essere ridotti negli ovari e nei frutti a 10 giorni dopo l'antesi (figura 4.2.13). L'aumentata espressione di *SIIAA27* nelle foglie potrebbe dunque spiegare l'accumulo di clorofilla, mentre la sua riduzione negli ovari e nei giovani frutti potrebbe contribuire a determinare la forma allungata dei frutti.

Infine si è deciso di considerare il gene *SIIAA9* perchè anche in questo caso il suo silenziamento determina fenotipi simili a quelli osservati a causa della sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX*. In particolare anche la soppressione mediante costruito antisense di *SIIAA9* determina la formazione di sepali che rimangono parzialmente uniti e la produzione di frutti partenocarpici (Wang *et al.*, 2005). Al momento non è stato ancora possibile investigare l'espressione di *SIIAA9* nei sepali, tuttavia l'analisi della sua espressione negli ovari, nei frutti a 10 giorni dopo l'antesi e nei frutti verde maturo, indica

una riduzione dei suoi trascritti (figura 4.2.13). Considerando che il silenziamento di tale gene interferisce con la formazione dei semi, si può ipotizzare che la sua ridotta espressione nei trasformanti 35S::TM8::SRDX possa essere alla base della partenocarpia osservata.

Per cercare poi di spiegare la non corretta formazione della zona di abscissione nei peduncoli fiorali si è deciso di investigare l'espressione del gene MADS-box *JOINTLESS*, per il quale è già stato definito un ruolo nella formazione di questa struttura. Infatti, la mancata o ridotta espressione di questo gene in seguito a mutazione o silenziamento impedisce a questa struttura di formarsi in maniera completa (Mao *et al.*, 2000). Come riportato in figura 4.2.13 vi è una consistente riduzione di espressione di questo gene nei peduncoli malformati 35S::TM8::SRDX. Potrebbe essere che l'espressione della chimera TM8::SRDX alteri la formazione dei complessi di fattori di trascrizione MADS-box che intervengono nella formazione delle zone in considerazione, innescando un qualche meccanismo di regolazione che porta alla riduzione nell'espressione di *JOINTLESS*.

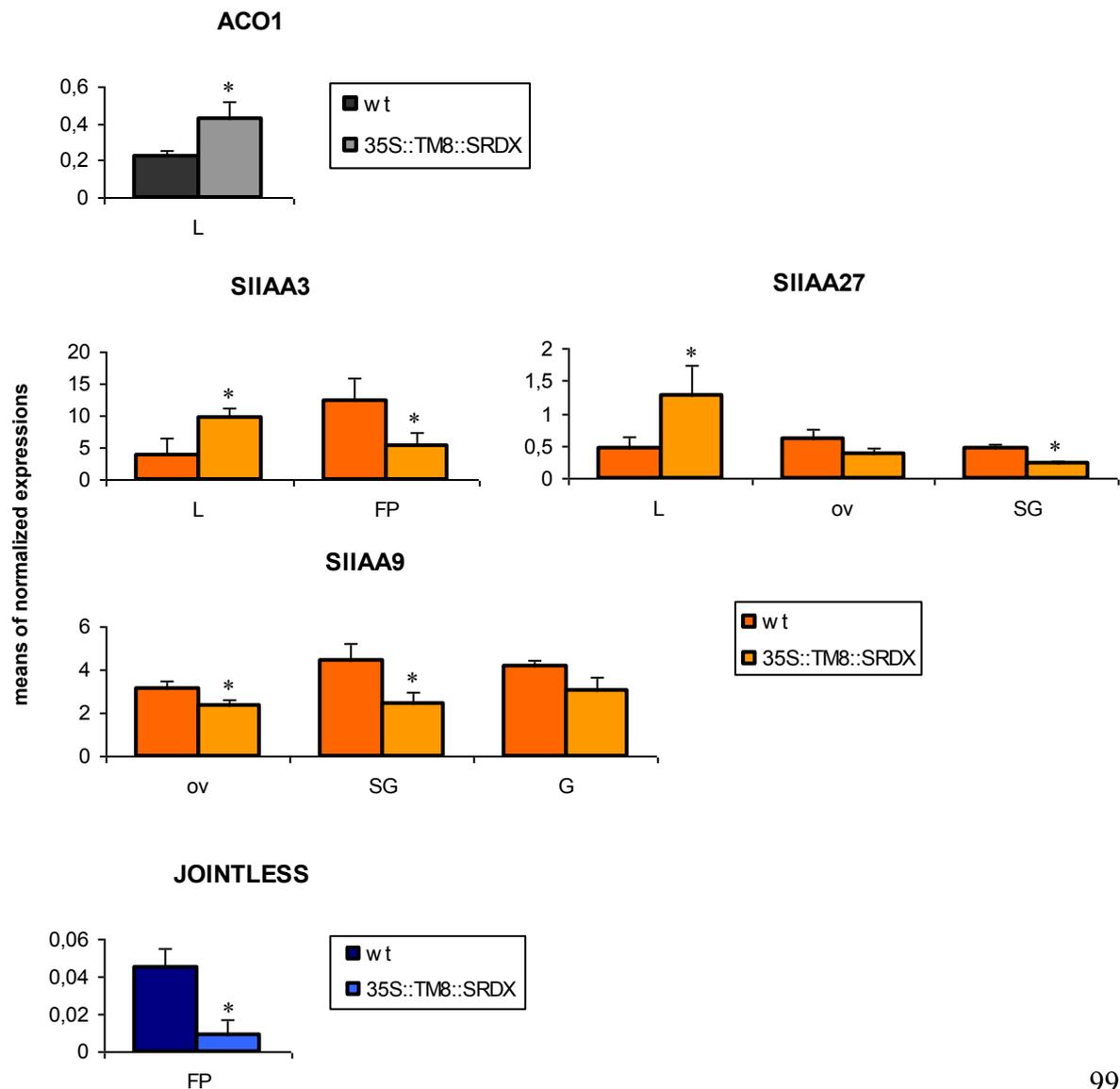


Figura 4.2.13: .: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, dei geni *ACO1*, *SIAA3*, *SIAA27*, *SIAA9* e del gene MADS box *JOINTLESS* nelle foglie (L), peduncoli fiorali (FP), ovari (ov), frutti a 10 giorni dopo l'antesi (SG), frutti verde maturo (G), delle piante sovra-esprimenti la chimera *TM8::SRDX* e del *wild-type* (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna dei trasformanti e quella relativa al wt ($P < 0.05$, t-test).

Anche l'espressione dei geni di identità florale è stata analizzata nelle piante trasformate con la chimera *35S::TM8::SRDX*. Per quanto concerne i geni di classe B si osserva un aumento di espressione di *SIGLO1* e *SIGLO2* sia nei petali che negli stami, mentre non vi sono variazioni di espressione relativamente a *TM6* e *TAP3* (figura 4.2.14). L'aumento dei trascritti di *SIGLO1* e *SIGLO2* negli stami è particolarmente interessante, dal momento che è esattamente l'opposto di quanto si verifica in seguito alla sovra-espressione di *TM8* (paragrafo 4.2.2.2). Ciò induce ad ipotizzare una possibile interazione diretta di questi due fattori di trascrizione con *TM8*.

Per quanto riguarda invece i geni di classe C, *TAG1* e *TAGL1*, non vi sono modifiche di espressione negli stami, tuttavia per entrambi si nota una lieve riduzione di espressione negli ovari (figura 4.2.14). La ridotta espressione di *TAG1* è di particolare rilievo se si considera che è stato ipotizzato che la formazione di pomodori partenocarpici nelle linee caratterizzate da una ridotta espressione di *SIAA9* possa essere imputata ad una ridotta espressione di *TAG1* (Wang *et al.*, 2009). Quindi, anche nel caso della sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX* la concomitante riduzione di espressione dei geni *SIAA9* e *TAG1* potrebbe contribuire alla formazione di frutti partenocarpici.

Infine, relativamente al gene di classe A *MC* non vi sono alterazioni a carico dei petali, mentre si assiste ad un aumento di espressione nel calice (figura 4.2.14), a livello del quale si osserva una non corretta separazione dei sepali.

Riassumendo, nei fiori *35S::TM8::SRDX* si assiste a variazione di espressione di alcuni dei geni di identità florale in tutti i verticilli, ciò supporta l'ipotesi, già avanzata nel paragrafo 4.2.2.2, di un possibile intervento di *TM8* nella formazione dei complessi proteici che controllano la formazione dei tre verticilli fiorali più esterni e permette di estenderlo anche al verticillo più interno. Come suggerito discutendo i risultati relativi ai geni di classe B, i dati molecolari portano a pensare ad una possibile interazione diretta con i fattori di trascrizione SIGLO. Quindi, considerando anche i dati relativi alla sovra-espressione di *TM8*, si può supporre un ruolo particolarmente importante per questo fattore di trascrizione nei complessi regolatori che determinano la formazione degli stami.

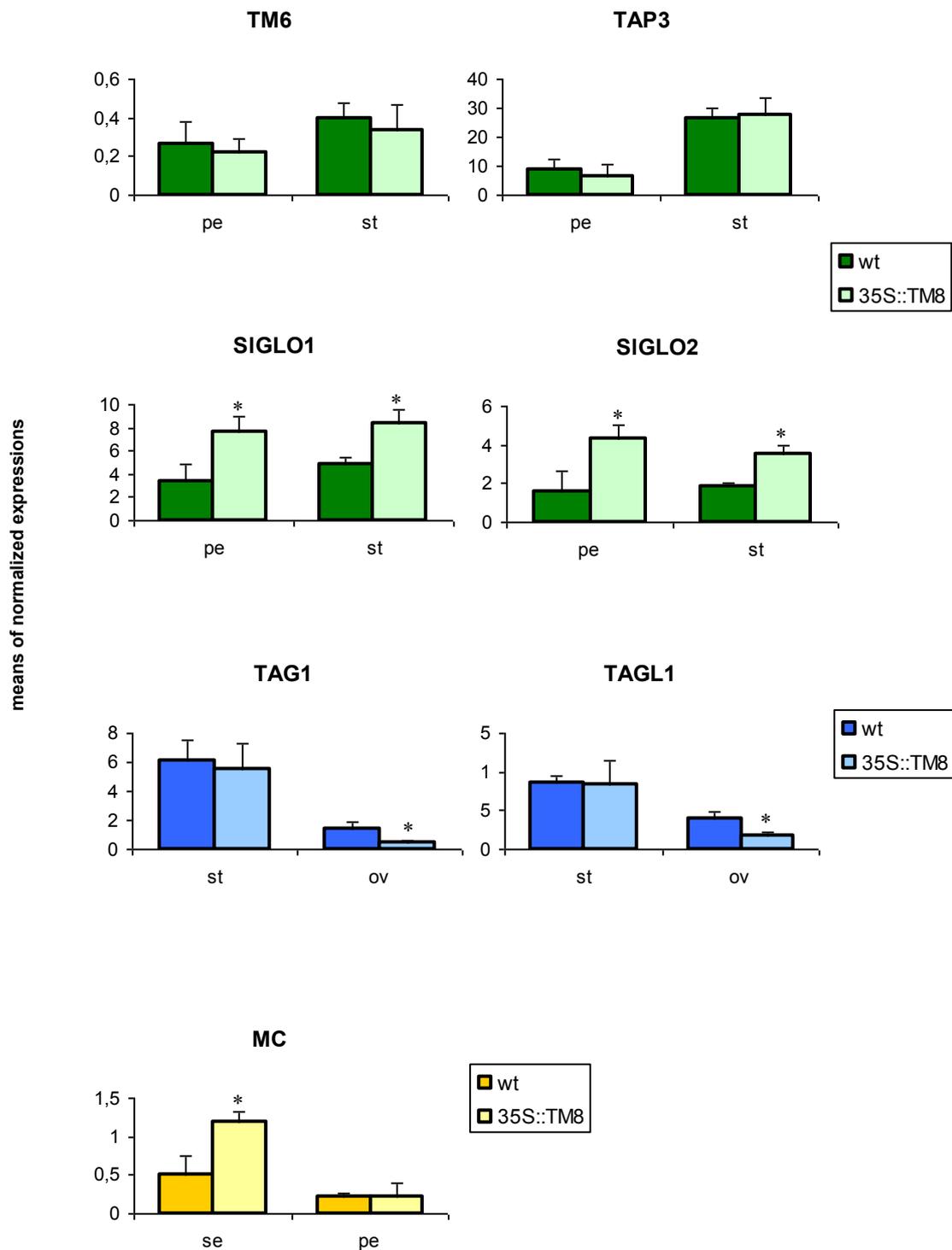


Figura 4.2.14: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, dei geni MADS-box di classe B (*TM6*, *TAP3*, *SIGLO1*, *SIGLO2*), di classe C (*TAG1*, *TAGL1*) e di classe A (*MC*) nei sepali (se), petali (pt), stami (st) ed ovari (ov) dei fiori 35S::TM8::SRDX e dei controlli (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna dei trasformanti e quella relativa al wt ($P < 0.05$, t-test).

Sono state infine condotte delle analisi molecolari per cercare di far luce sia sulla variazione della forma dei frutti 35S::*TM8*::SRDX, sia sui tempi di maturazione degli stessi.

Sebbene i meccanismi molecolari che controllano la forma del frutto non siano stati ancora ben definiti, in pomodoro sono stati identificati alcuni geni coinvolti nel controllo di questo aspetto. In particolare è noto che nella maggior parte delle varietà di pomodoro ovoidali o ellissoidali vi è una mutazione che determina la comparsa di un codone di stop prematuro nel gene *OVATE*, per il quale è stato proposto un ruolo come regolatore negativo della crescita (Liu *et al.*, 2001). Come riportato in figura 4.2.15 l'espressione di questo gene risulta essere ridotta sia negli ovari sia nei frutti a 10 giorni dopo l'antesi, indicando come questa riduzione potrebbe contribuire a determinare il fenotipo osservato.

Per avere informazioni a livello molecolare sull'andamento della maturazione nei frutti 35S::*TM8*::SRDX è stata analizzata l'espressione del gene *ACO1*. Come sopra-descritto questo gene codifica per un enzima implicato nella biosintesi dell'etilene ed in particolare nella produzione di etilene climaterico nel frutto. In figura 4.2.15 si può osservare che il profilo di espressione di *ACO1* nei frutti 35S::*TM8*::SRDX è nel complesso confrontabile con quello osservato nei frutti selvatici. Questo dato suggerisce quindi che l'etilene venga prodotto nei frutti transgenici in quantità confrontabili con quelle dei frutti *wild-type*. Dal momento che questo risultato non permette di dare spiegazioni relativamente al rallentamento della maturazione osservato, sarà necessario effettuare delle misure di etilene nei frutti ed eventualmente studiare l'espressione di altri geni coinvolti nella biosintesi di questo ormone.

Tuttavia, poiché è noto che in pomodoro ci sono fattori (ad es. i geni *RIN* e *TAGL1*, paragrafo 1.3.1) in grado di controllare la maturazione dei pomodori agendo "a monte" dell'etilene, si è deciso di cercare di far luce sul fenotipo osservato andando ad analizzare l'espressione dei geni MADS-box *TAGL1* e *RIN*. Come si può osservare in figura 4.2.15, mentre nei frutti *wild-type* l'espressione di questi geni raggiunge il massimo nella fase di frutto breaker e poi diminuisce nel frutto rosso, nei frutti 35S::*TM8*::SRDX l'espressione di *TAGL1* non si modifica nel passaggio dalla fase di frutto breaker a quella di frutto rosso, mentre l'espressione di *RIN* continua a salire anche nella fase di frutto rosso. Sulla base di questi dati, sembra che i frutti rossi transgenici, macroscopicamente maturi, non lo siano del tutto da un punto di vista molecolare.

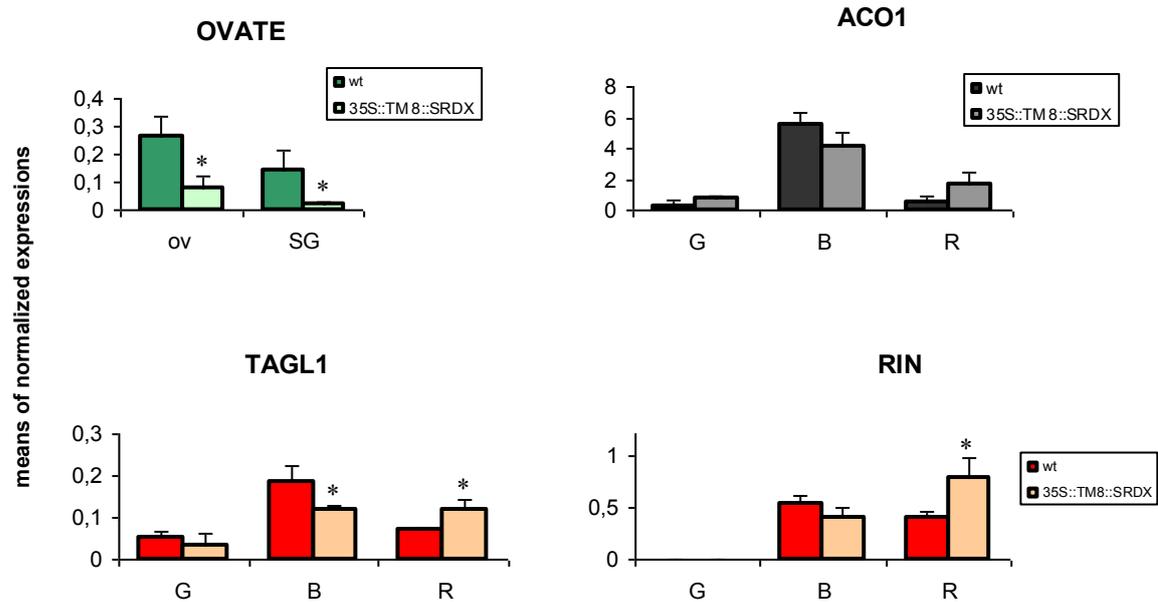


Figura 4.2.15: Analisi di espressione, mediante esperimenti di *real-time* PCR, dei geni *OVATE*, *ACO1* e dei geni MADS-box *TAGL1* e *RIN* negli ovari (ov), frutti a 10 giorni dopo l'antesi (SG), frutti verde maturo (G), frutti breaker (B) e frutti rossi (R) delle piante sovra-esprimenti la chimerica 35S::TM8::SRDX e del *wild-type* (wt). Le barre d'errore indicano le D.S. delle medie degli esperimenti effettuati su tre trasformanti e due selvatici. Gli asterischi indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra la colonna dei trasformanti e quella relativa al wt ($P < 0.05$, t-test).

4.2.3 Conclusioni

Negli ultimi venti anni la ricerca nell'ambito dei geni MADS-box di tipo MIKC ha permesso di far luce sulle funzioni di pressoché tutte le sottofamiglie di questa famiglia di fattori di trascrizione. I geni *TM8-like* rappresentano un'eccezione dal momento che nessuno dei rappresentanti di questo clade è stato fino ad oggi funzionalmente caratterizzato (Heijmans *et al.*, 2012). Questo gruppo di geni MADS-box ha attratto la nostra attenzione in quanto i geni *TM8-like* di Gimnosperme che sono stati ad oggi studiati presentano un profilo di espressione simile a quello pubblicato per il gene *TM8* di pomodoro (Lovisetto *et al.*, 2012), suggerendo che essi possano aver mantenuto la propria funzione durante l'evoluzione delle Spermatofite.

Dal momento che le Gimnosperme non si prestano a studi funzionali, si è deciso di caratterizzare funzionalmente il gene *TM8* di pomodoro per cercare di definire il ruolo di questa sottofamiglia genica. A tal fine sono state prodotte piante transgeniche di pomodoro che sovra-esprimono il gene e piante che sovra-esprimono invece il gene nella forma di

repressore trascrizionale. La caratterizzazione fenotipica e molecolare di tali piante ha messo in evidenza un quadro funzionale piuttosto complesso.

La sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX*, in particolare, determina una serie di anomalie fenotipiche (epinastia fogliare, curvatura dei peduncoli fiorali, partenocarpia) che possono essere messe in relazione all'auxina e/o al suo *cross-talk* con l'etilene. Le modifiche nell'espressione di alcuni geni *Aux/IAA* inducono ad ipotizzare che un'alterazione nella via di trasduzione del segnale dell'auxina potrebbe essere alla base dei fenotipi osservati. *TM8* potrebbe dunque intervenire nel regolare l'espressione di questi geni oppure i regolatori trascrizionali codificati da questi ultimi potrebbero far parte dei complessi regolatori in cui è coinvolto lo stesso *TM8*. E' già stato dimostrato che altri fattori di regolazione sono presenti nei complessi multimerici attraverso i quali agiscono i fattori di trascrizione MADS-box (paragrafo 1.1.5). Nel caso di quest'ultima ipotesi, l'alterata espressione dei geni *Aux/IAA* potrebbe essere il risultato di conseguenti meccanismi di regolazione a *feed-back*. Una possibile relazione tra geni MADS-box e la via di trasduzione del segnale dell'auxina è già stata messa in evidenza in *A. thaliana*, in particolare è stato ipotizzato che il gene *SEP3* possa intervenire nella formazione del fiore modulando le risposte all'auxina (Kaufmann *et al.*, 2009). I fenotipi osservati in seguito alla sovra-espressione di *TM8* nella forma di repressore suggeriscono dunque che *TM8* possa intervenire in vari aspetti dello sviluppo sia vegetativo che riproduttivo della pianta, modulando le risposte a questo ormone.

Altri dati ottenuti in questo lavoro depongono a favore di un ruolo del gene *TM8* durante lo sviluppo riproduttivo. In particolare l'osservazione degli stami dialitici nelle piante che sovra-esprimono *TM8*, insieme alle analisi molecolari condotte nei fiori di entrambi i tipi di piante transgeniche prodotte, indicano che *TM8* possa prendere parte alla formazione dei complessi regolatori che controllano la formazione del fiore. Come già suggerito nei risultati, il fatto che i geni *SIGLO* presentino rispettivamente una diminuzione ed un aumento di espressione in seguito alla sovra-espressione di *TM8* e della chimera *TM8::SRDX* induce ad ipotizzare una interazione diretta di tali fattori di trascrizione con *TM8*. L'azione sinergica con i geni di classe B è supportata dall'osservazione degli stami dialitici e suggerisce un ruolo preponderante per *TM8* nella formazione degli stami. Considerando che i geni di classe B intervengono anche nella formazione dei petali, ed alterazioni di espressione dei geni *SIGLO* si osservano anche in questi organi fiorali in entrambi i tipi di trasformanti prodotti, potrebbe essere che *TM8* abbia un ruolo importante anche in questo verticillo, sebbene non vi siano anomalie fenotipiche a supportarlo. Inoltre, l'osservazione di frutti partenocarpici in seguito alla sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX* e la concomitante riduzione di espressione del gene *TAG1*, noto per aver un ruolo nel *fruit-set* (Wang *et al.*, 2009), suggeriscono una possibile funzione di *TM8* anche nella formazione degli ovari. Per cercare di avvalorare queste ipotesi, stiamo ora

collaborando con un gruppo di ricerca dell'Università di Milano che dovrebbe condurre un esperimento di doppio ibrido di lievito al fine di identificare possibili proteine MADS-box in grado di interagire con *TM8*.

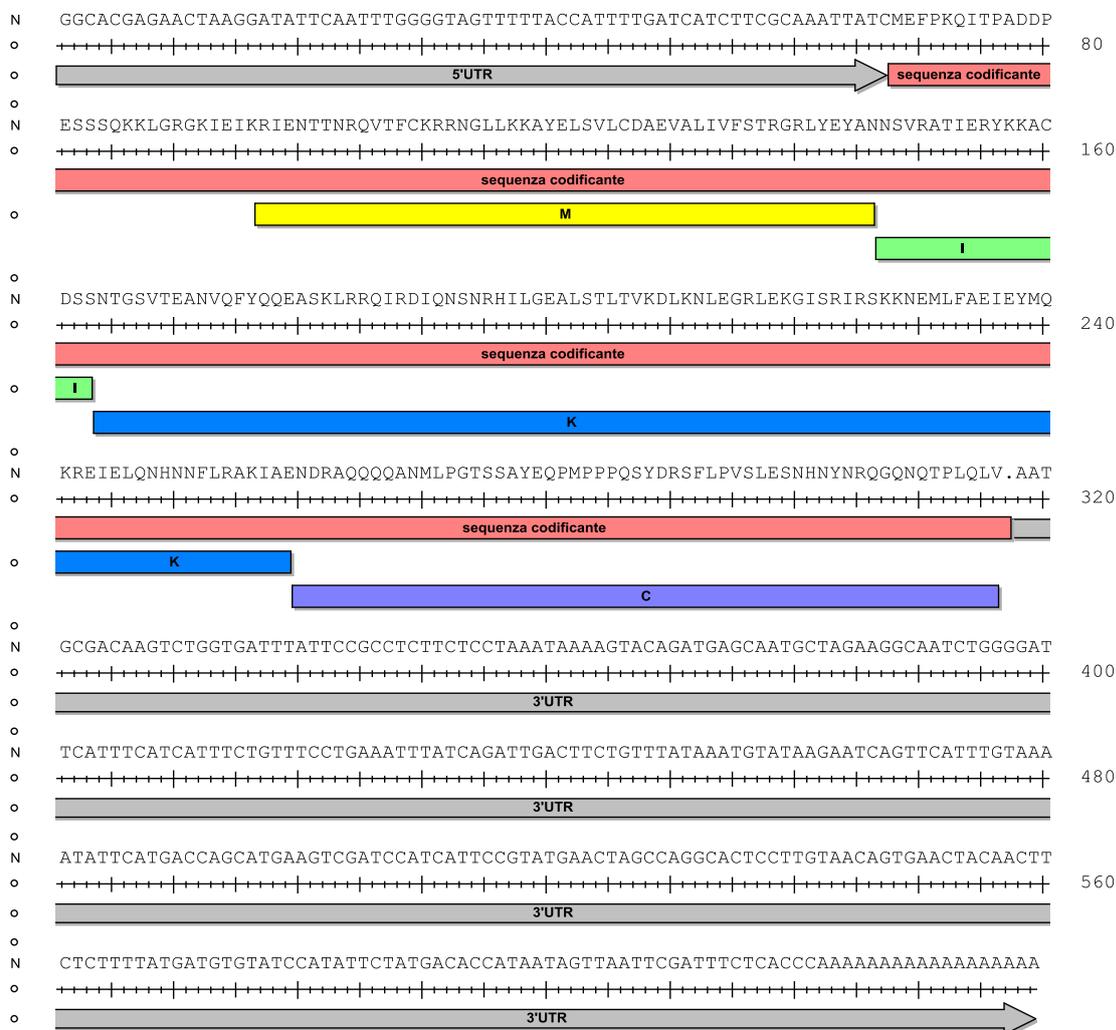
Come indicato nel paragrafo 1.1.5, negli ultimi anni si è iniziato a porre in questione la validità generale del "modello ABC". Se l'esperimento di doppio ibrido dovesse identificare una interazione tra *TM8* e qualche fattore di trascrizione MADS-box di identità florale, si renderebbe necessaria la riformulazione del modello per pomodoro, includendo anche *TM8* tra i geni che controllano la formazione del fiore.

Infine, l'alterata forma dei pomodori ed il rallentamento della maturazione osservati in conseguenza alla sovra-espressione della chimera *TM8::SRDX* indicano un possibile ruolo di *TM8* anche durante lo sviluppo e la maturazione del frutto. *TM8* potrebbe dunque far parte dei *network* molecolari che regolano questi processi fisiologici. *OVATE*, insieme ad altri geni che controllano la forma del frutto, potrebbe essere *target* dei complessi regolatori che intervengono nella formazione del frutto. *RIN* e *TAGL1*, com'è noto (paragrafo 1.3.1), costituiscono invece parte del *network* che interviene nella maturazione, pertanto è plausibile pensare che l'alterata espressione di questi ultimi due geni nei frutti *35S::TM8::SRDX* sia innescata da un qualche meccanismo di regolazione indiretto.

Concludendo, i risultati derivanti dall'analisi delle piante transgeniche ottenute sembrano indicare una funzione per il gene *TM8* sia nello sviluppo di organi vegetativi (foglia) che in quello di organi riproduttivi (fiore, frutto). Questo suo ruolo in varie fasi del ciclo vitale della pianta supporta l'idea che i geni *TM8-like* siano geni antichi, originatisi precocemente durante l'evoluzione dei geni MADS-box, come suggerisce anche la loro posizione basale nelle filogenesi dei geni *MIKC* (Doyle, 1994; Purugganan *et al.*, 1995; Hilemann *et al.*, 2006). A tal riguardo è interessante ricordare che in *G.biloba* sono stati identificati ben tre geni *TM8-like* caratterizzati da un'espressione ubiquitaria durante lo sviluppo della pianta (Lovisetto *et al.*, 2012). Inoltre, il coinvolgimento del gene *TM8* di pomodoro nello sviluppo e nella maturazione del frutto suggerisce che anche nelle Gimnosperme tali geni possano intervenire durante lo sviluppo delle strutture che permettono la dispersione dei semi.

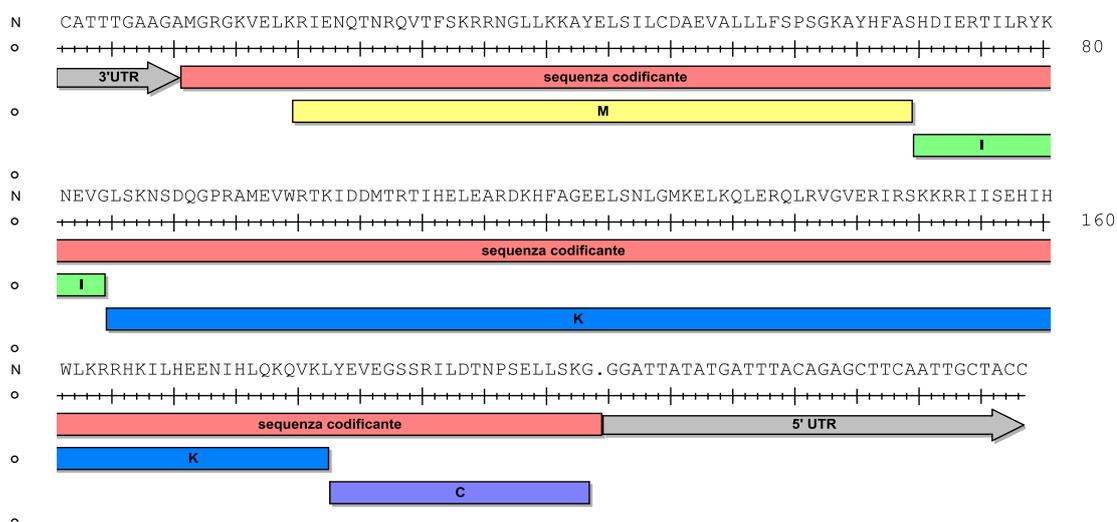
5. Allegati

5.1 Sequenza *FaSHP* di *Fragaria x ananassa*



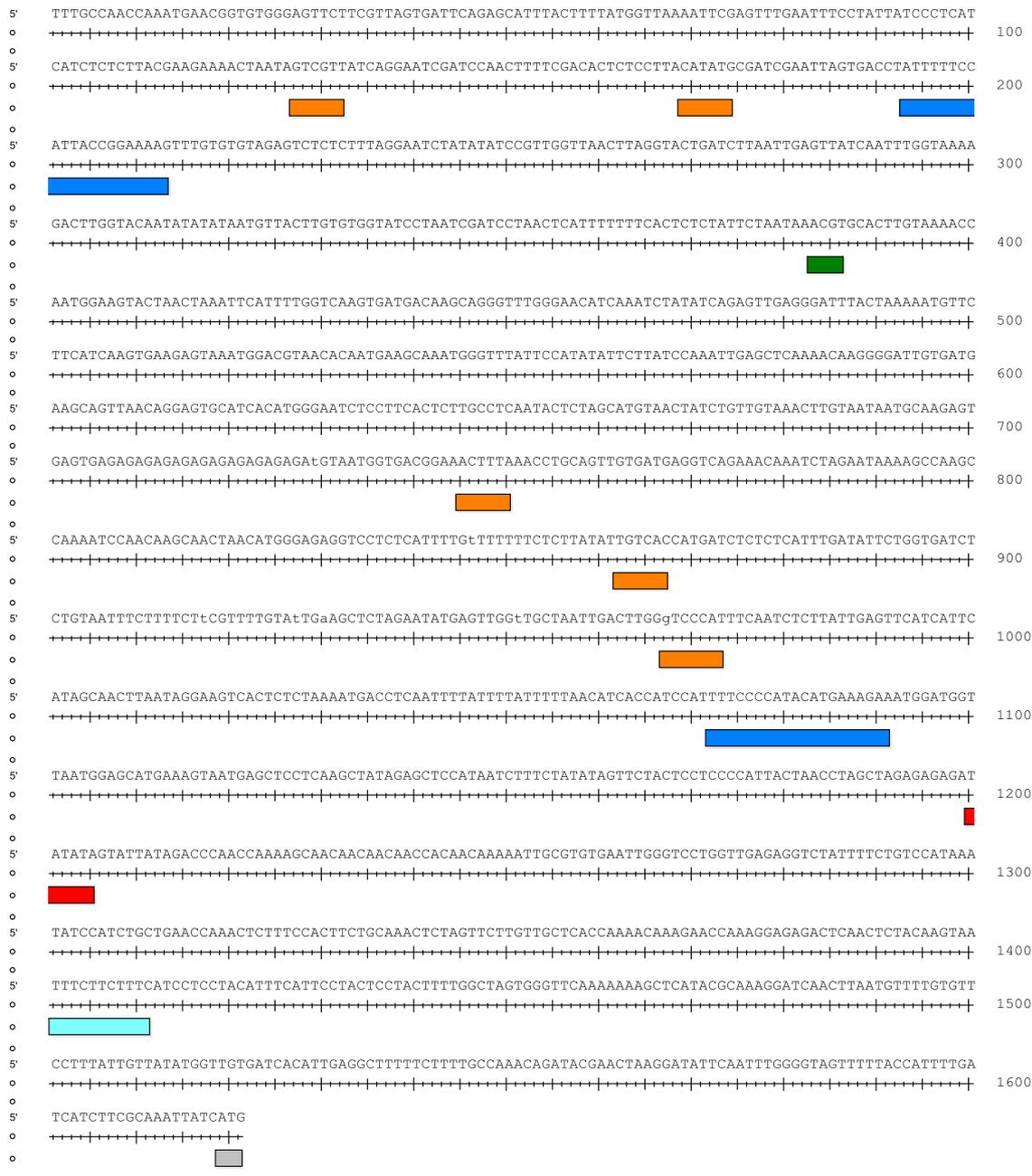
Allegato 5.1: Sequenza nucleotidica e amminoacidica dedotta del gene *FaSHP* di fragola. In grigio le sequenze 5' UTR e 3' UTR. In rosa la sequenza amminoacidica dedotta. I riquadri M, I, K, C corrispondono ai domini caratteristici dei fattori di trascrizione MADS-box di tipo MIKC.

5.2 Sequenza *TM8* di *Solanum lycopersicum*



Allegato 5.2: Sequenza nucleotidica e amminoacidica dedotta del gene *TM8* di pomodoro. In grigio le sequenze 5' UTR e 3' UTR. In rosa la sequenza amminoacidica dedotta. I riquadri M, I, K, C corrispondono ai domini caratteristici dei fattori di trascrizione MADS-box di tipo MIKC.

5.3 Sequenza del promotore del gene *FaSHP*



Allegato 5.3: Sequenza nucleotidica del promotore del gene *FaSHP*. In arancione gli elementi di risposta all'auxina, in verde l'elemento di risposta all'ABA. In blu le sequenze CARG-box, in rosso la sequenza TATA box, in azzurro la sequenza ricca in pirimidine ed in grigio il codone ATG.

6. Bibliografía

Agius F., González-Lamothe R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* 21: 177-181.

Aharoni A., O'Connell A.P. (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* 53: 2073-2087.

Aharoni A., Vos C.H.R.D., Wein M., Sun Z., Greco R., Kroon A., Mol J.N.M., O'Connell A.P. (2001). The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 28: 319-332.

Albert V.A., Soltis D.E., Carlson J.E., Farmerie W.G., Wall P.K., Ilut D.C., Solow T.M., Mueller L.A. Landherr L.L., Hu Y., Buzgo M., Kim S., Yoo M.J. Frohlich M.W., Perl-Treves R., Schlarbaum S.E., Bliss B.J., Zhang X., Tanksley S.D., Oppenheimer D.G., Soltis P.S., Ma H., DePamphilis C.W., Leebens-Mack J.H. (2005) Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biol.* 30; 5:5.

Alexander L., Grierson D. (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. *J Exp Bot.* 53: 2037-2055.

Almeida J., D'Amico E., Preuss A., Carbone F., Ric de Vos C.H, Deiml B., Mourgues F., Perrotta G., Fischer T.C., Bovy A.G., Martens S., Rosati C. (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465: 61–71.

Ando S., Sato Y., Kamachi S., Sakai S. (2001) Isolation of a MADS-box gene (ERAF17) and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Planta* 213: 943-952.

Archbold D.D., Dennis F.G.J. (1985). Strawberry receptacle growth and endogenous IAA content as affected by growth regulator application and achene removal. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 816-820.

Barry C.S., Blume B., Bouzayen M., Cooper W., Hamilton A.J., Grierson D. (1996) Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9(4): 525-535.

Barry C.S., Fox E.A., Yen H., Lee S., Ying T., Grierson D., Giovannoni J.J. (2001) Analysis of the ethylene response in the epinastic mutant of tomato. *Plant Physiol.* 127(1): 58-66.

Bassa C., Mila I., Bouzayen M., Audran-Delalande C. (2012) Phenotypes associated with down-regulation of Sl-IAA27 support functional diversity among Aux/IAA family members in tomato. *Plant Cell Physiol.* 53(9): 1583-1595.

Becker A., Theissen G. (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol.* 29(3): 464-489.

Bemer M., Karlova R., Ballester A.R., Tikunov Y.M., Bovy A.G., Wolters-Arts M., Rossetto Pde B., Angenent G.C., de Maagd R.A. (2012) The Tomato FRUITFULL Homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 Regulate Ethylene-Independent Aspects of Fruit Ripening. *Plant Cell* 24(11): 4437-4451.

Brummell D.A., Harpster M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plant. *Plant Mol Biol.* 47: 311-339.

Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B. (2010) Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1): 73-79.

Chaabouni S., Jones B., Delalande C., Wang H., Li Z., Mila I., Frasse P, Latché A., Pech J.C., Bouzayen M. (2003) Sl-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *J Exp Bot.* 60(4): 1349-1362.

Chang S., Puryear J., Cairney J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11: 113-116.

Chen J.Y., Liu D.J., Jiang Y.M., Zhao M.L., Shan W., Kuang J.F., Lu W.J. (2011) Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS One* 6(9): e24649.

Chervin C., El-Kereamy1 A., Roustan J.P., Latché A., Lamon J., Bouzayen M. (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non climacteric fruit. *Plant Science* 167: 1301–1305.

Chervin C., Tira-Umphona A., Terrierb N., Zouinea M., Severac D., Roustana J.P. (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiologia Plantarum* 134: 534–546.

Chung M.Y., Vrebalov J., Alba R., Lee J., McQuinn R., Chung J.D., Klein P., Giovannoni J.J. (2010) A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SLAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J.* 64(6): 936-947.

Cirillo C., Kang G.Q., Acciari N., Nervo G., Rotino G.L., Schiavi M. (1997) Rigenerazione in vitro e trasformazione genetica di linee parentali di pomodoro da mensa. *Italus Hortus* 4(5): 28-34.

Coen E.S., Meyerowitz E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353(6339): 31-37.

- Cruz-Rus E., Amaya I., Sánchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Valpuesta V.** (2011) Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J Exp Bot.* 62(12): 4191-4201.
- Csukasi F., Osorio S., Gutierrez J.R., Kitamura J., Giavalisco P., Nakajima M., Fernie A.R., Rathjen J.P., Botella M.A., Valpuesta V., Medina-Escobar N.** (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist* 191: 376–390.
- Davies C., Boss P.K., Robinson S.P.** (1997) Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiol.* 115(3): 1155-1161.
- De Folter S., Angenent C.** (2006) *Trans* meets *cis* in MADS science. *Trends in Plant Science* 11(5): 224-231.
- De Martino G., Pan I., Emmanuel E., Levy A., Irish V.F.** (2006) Functional analyses of two tomato APETALA3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell* 18(8): 1833-1845.
- Díaz-Riquelme J., Lijavetzky D., Martínez-Zapater J.M., Carmona M.J.** (2009) Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol.* 149(1): 354-369.
- Ditta G., Pinyopich A., Robles P., Pelaz S., Yanofsky M.F.** (2004) The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol.* 14(21): 1935-1940.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 52(4): 673-689.
- Doyle J.T.** (1994) Evolution of a Plant Homeotic Multigene Family: Toward Connecting Molecular Systematics and Molecular Developmental Genetics. *Systematic Biology* 43 (3): 307-328.
- Egea-Cortines M., Saedler H., Sommer H.** (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 18(19): 5370-5379.
- Elitzur T., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Goldschmidt E.E., Friedman H.** (2010) The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *J Exp Bot.* 61(5): 1523-1535.
- El-Sharkawy I., Sherif S., Mahboob A., Abubaker K., Bouzayen M., Jayasankar S.** (2012) Expression of auxin-binding protein1 during plum fruit ontogeny supports the potential role of auxin in initiating and enhancing climacteric ripening. *Plant Cell Rep.* 31(10): 1911-1921.

Fait A., Hanhineva K., Beleggia R., Dai N., Rogachev I., Nikiforova V.J., Fernie A.R., and Aharoni A. (2008) Reconfiguration of the Achene and Receptacle Metabolic Networks during Strawberry Fruit Development. *Plant Physiol.* 148:730-750.

Ferrandiz C., Liljegren S.J., Yanofsky M.F. (2000) Negative Regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* 289: 436-438.

Figueroa C.R., Rosli H.G., Civello P.M., Martrinez G.A., Herrera R., Moya-Leon M.A. (2010) Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria x ananassa* fruits. *Scientia Horticulturae* 124: 454–462.

Fourquin C., Ferrándiz C. (2012) Functional analyses of AGAMOUS family members in *Nicotiana benthamiana* clarify the evolution of early and late roles of C-function genes in eudicots. *Plant J.* 71(6): 990-1001.

Fujisawa M., Shima Y., Higuchi N., Nakano T., Koyama Y., Kasumi T., Ito Y. (2012) Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta* 235(6): 1107-1122.

Fulton T.M. , Chunwongse, J. and Tanksley, S.D. (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 207-209.

Futamura N., Totoki Y., Toyoda A., Igasaki T., Nanjo T., Seki M., Sakaki Y., Mari A., Shinozaki K., Shinohara K. (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC genomics.* 9: 383-397.

Geuten K., Irish V. (2010) Hidden variability of floral homeotic B genes in Solanaceae provides a molecular basis for the evolution of novel functions. *Plant Cell* 22(8): 2562-2578.

Giménez E., Pineda B., Capel J., Antón M.T., Atarés A., Pérez-Martín F., García-Sogo B., Angosto T., Moreno V., Lozano R. (2010) Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One* 5(12): e14427.

Giovannoni J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180.

Given N.K., Venis N.A., Grierson D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climateric fruit. *Planta* 174: 402-404.

Gramzow L., Ritz M.S., Theissen G. (2010) On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends Genet.* 26(4): 149-153.

- Gramzow L., Theissen G.** (2010) A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol.* 11(6): 214.
- Hamilton A.J., Lycett G.W., Grierson D.** (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.
- Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A.** (2000) DNA cloning using in vitro sitespecific recombination. *Genome Research* 10: 1788–1795.
- Heijmans K., Morel .P, Vandenbussche M.** (2012) MADS-box genes and floral development: the dark side. *J Exp Bot.* 63(15): 5397-5404.
- Hileman L.C., Sundstrom J.F., Litt A., Chen M., Shumba T., Irish V.F.** (2006) Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Mol. Biol. Evol.* 23: 2245-2258.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T., Ohme-Takagi M.** (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *Plant J.* 34(5): 733-739.
- Hoffmann T., Kalinowski G., Schwab W.** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* 48(5): 818-826.
- Iannetta, P.P.M., Laarhoven, L.-J., Medina-Escobar, N., James, E.K., McManus, M.T., Davies, H.V., and Harren, F.J.M.** (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum* 127: 247–259.
- Immink R.G.H., Kaufmann K., Angenent G.C.** (2010) The "ABC" of MADS domain protein behaviour and interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21: 87-93.
- Itkin M., Seybold H., Breitel D., Rogachev I., Meir S., Aharoni A.** (2009) TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J.* 60(6): 1081-1095.
- Jaakola L., Poole M., Jones M.O., Kamarainen-Karppinen T., Koskimaki J.J., Hohtola A., Haggman H., Fraser P.D., Manning K., King G.J., Thomson H., Seymour G.B.** (2010) A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol* 153(4): 1619-1629.
- Jia H.F., Chai Y.M., Li C.L., Lu D., Luo JJ, Qin L, Shen YY.** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of **strawberry** fruit ripening. *Plant Physiol.* 157(1): 188-199.
- Jiang Y., Joyce D.C.** (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* 39: 171-174.

Jiménez-Bermúdez S., Redondo-Nevado J., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L., Lopez-Aranda J.M., Valpuesta V., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A., José A. (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128(2): 751-759.

Karlova R., Rosin F.M., Busscher-Lange J., Parapunova V., Do P.T., Fernie A.R., Fraser P.D., Baxter C., Angenent G.C., de Maagd R.A. (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23(3): 923-941.

Katz E., Lagunes P.M., Riov J., Weiss D., Goldschmidt E.E. (2004) Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta* 219(2): 243-252.

Kaufmann K., Melzer R., Theissen G. (2005) MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347(2): 183-198.

Kaufmann K., Muiño J.M., Jauregui R., Airoidi C.A., Smaczniak C., Krajewski P., Angenent G.C. (2009) Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower. *PLoS Biol.* 21;7(4):e1000090.

Klee H.J., Giovannoni J.J. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet.* 45: 41-59.

Koyama K., Sadamatsu K., Yamamoto N.G. (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct Integr Genomics.* 10: 367–381.

Kramer E.M., Jaramillo M.A., Di Stilio V.S. (2004) Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics* 166(2): 1011-1023.

Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell.* 6(4): 521-530.

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1985) Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents. *Biol. Soc. Trans.* 11: 591-592.

Liljgren S.J., Ditta G.S., Eshed Y., Savidge B., Bowman J.L., Yanofsky M.F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-769.

Lin-Wang K., Bolitho K., Grafton K., Kortstee A., Karunairetnam S., McGhie T.K., Espley R.V., Hellens R.P., Allan A.C. (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*. *BMC Plant Biology* 10: 50-66.

- Lin Z., Arciga-Reyes L., Zhong S., Alexander L., Hackett R., Wilson I., Grierson D.** (2008a) SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development. *J Exp Bot.* 59(15): 4271-4287.
- Lin Z., Hong Y., Li C., Zhang K., Grierson D.** (2008b) A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant J.* 55(2): 301-310.
- Lin Z., Zhong S., Grierson D.** (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot.* 60(12): 3311-3336.
- Liu J., Van Eck J., Cong B., Tanksley S.D.** (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20): 13302-13306.
- Lovisetto A.** (2007) Geni ortologhi di *AGAMOUS* sono espressi nelle strutture carnose che accompagnano i semi di *Taxus baccata* e *Ginkgo biloba*. Tesi di Laurea dell'Università di Padova.
- Lovisetto A., Guzzo F., Tadiello A., Toffali K., Favretto A., Casadoro G.** (2012) Molecular analyses of MADS-box genes trace back to Gymnosperms the invention of fleshy fruits. *Mol Biol Evol.* 29(1): 409-419.
- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T.** (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. *Int J Dev Biol.* 53(8-10): 1635-1648.
- Lunkenbein S., Coiner H.A., Ric de Vos C.H., Schaart J.G., Boone M.J., Krens F.A., Schwab W., Salentijn E.M.J.** (2006). Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2145–2153.
- Manning K.** (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* 194: 62-68.
- Manning K., Tör M., Poole M., Hong Y., Thompson A.J., King G.J., Giovannoni JJ, Seymour G.B.** (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet.* 38(8): 948-592.
- Mao L., Begum D., Chuang H.W., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A.** (2000) JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406(6798): 910-913.
- Martel C., Vrebalov J., Tafelmeyer P., Giovannoni J.J.** (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol.* 157(3): 1568-1579.

Martínez G.A., Chaves A.R., Añón M.C. (1996) Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch). *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 139–146.

Masiero S., Colombo L., Grini P.E., Schnittger A., Kater M.M. (2011) The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction. *Plant Cell* 23(3): 865-872.

Matsui K., Ohme-Takagi M.(2010) Detection of protein-protein interactions in plants using the transrepressive activity of the EAR motif repression domain. *Plant J.* 61(4): 570-578.

Medina-Escobar N., Cárdenas J., Moyano E., Caballero J.L., and Muñoz-Blanco J. (1997). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology* 34: 867-877.

Melzer R., Wang Y.Q., Theissen G. (2010) The naked and the dead: the ABCs of Gymnosperm reproduction and the origin of the Angiosperm flower. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21: 118-128.

Mercado J.A., Trainotti L., Jiménez-Bermúdez L., Santiago-Doménech N., Posé S., Donolli R., Barceló M., Casadoro G., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A. (2010) Evaluation of the role of the endo- β -(1,4)-glucanase gene *FaEG3* in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* 55: 8–14.

Messenguy F., Dubois E. (2003) Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316:1-21.

Miller A.N., Walsh C.S., Cohen J.D. (1987) Measurement of indole-3-acetic acid in peach fruits (*Prunus persica* L. Batsch cv. Redhaven) during development. *Plant Physiol.* 84: 491-494.

Nitsch J. (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Am J Bot* 37: 211-215.

Oeller P., Min-Wong L., Taylor L., Pike D., Theologis A. (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.

Osorio S., Alba .R, Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanon M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z., Giovannoni J.J., Fernie A.R. (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol.* 157(1): 405-425.

Pan I.L., McQuinn R., Giovannoni J.J., Irish V.F. (2010) Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *J Exp Bot.* 61(6):1795-1806.

- Payasi A., Mishra N.N., Chaves A.L.S., Singh R.** (2009). Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15(2): 103-113.
- Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.F.** (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Pellegrini L., Tan S., Richmond T.J.** (1995) Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376: 490-498.
- Perkins-Veazie P.** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews* 17, 267-297.
- Pitto L., Giorgetti L., Turrini A., Evangelista M., Luccarini G., Colella C., Collina F., Caltavuturo L., Nuti Ronchi V.** (2001) Floral genes expressed in tomato hypocotyl explants in liquid culture. *Protoplasma*. 218(3-4): 168-179.
- Pnueli L., Abu- Abeid M., Zamir D., Nacken W., Schwarz-Sommer Z., Lifschitz E.** (1991) The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 1: 255-266.
- Pombo M.A., Martínez G.A., Civello P.M.** (2011) Cloning of *FaPAL6* gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Sci.* 181(2): 111-118.
- Posé S., García-Gago J.A., Santiago Doménech N., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A., Mercado J.A.** (2011) Strawberry fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants. *Genes, Genomes and Genomics* 5(1): 40-48.
- Purugganan M. D., Rounsley S. D., Schmidt R.J., Yanofsky M. F.** (1995) Molecular Evolution of Flower Development: Diversification of the Plant MADS-Box Regulatory Gene Family. *Genetics* 140: 345-356.
- Qin G., Wang Y., Cao B., Wang W., Tian S.** (2012) Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *Plant J.* 70(2): 243-255.
- Quesada M.A., Blanco-Portales R., Pose S., García-Gago J.A., Jiménez-Bermúdez S., Muñoz-Serrano A., Caballero J.L., Pliego-Alfaro F., Mercado J.A., Muñoz-Blanco J.** (2009) Antisense down-regulation of the *FaPGL* gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiol.* 150: 1022-1032.
- Raab T., López-Ráez J.A., Klein D., Caballero J.L., Moyano E., Schwab W., Muñoz-Blanco J.** (2006). FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell* 18: 1023-1037.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichorn S.E.** (2002) Biologia delle piante. Sesta edizione. Zanichelli.

Rosin F.M., Aharoni A., Salentijn E.M.J., Schaart J.G., Boone M.J., and Hannapel D.J. (2003) Expression patterns of a putative homolog of *AGAMOUS*, *STAG1*, from strawberry. *Plant Science* 165: 959-968.

Ruan Y.L., Patrick J.W., Bouzayen M., Osorio S., Fernie A.R. (2012) Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci.* 2012 Nov;17(11): 656-665.

Saitou N., Nei M. (1987) The Neighbor-Joining Method- a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Saladié M., Matas A.J., Isaacson T., Jenks M.A., Goodwin S.M., Niklas K.J., Xiaolin R., Labavitch J.M., Shackel K.A., Fernie A.R., Lytovchenko ., O'Neill M.A., Watkins C.B., Rose J.K. (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* 144(2): 1012-1028.

Salisbury F.B., Ross C.W. (1978) Plant Physiology. Second edition. *Wadsworth Publishing Company.*

Santiago-Domenech N., Jimenez-Bemudez S., Matas A.J., Rose J.K.C., Munoz-Blanco J., Mercado J.A., and Quesada M.A. (2008) Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J. Exp. Bot.* 59: 2769-2779.

Schieberle P., Hofmann T. (1997) Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of agricultural and food chemistry* 45(1): 227-232.

Schwab W., Hoffmann T., Kalinowski G., Preuss A. (2011) Functional genomics in strawberry fruits through RNAi mediated silencing. *Genes, Genomes and Genomics* 5: 91-101.

Seymour G.B., Chapman N.H., Chew B.L., Rose J.K. (2012) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnol J.* doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00738.

Seymour G.B., Ryder C.D., Cevik V., Hammond J.P., Popovich A., King G.J., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Manning K. (2011) A *SEPALLATA* gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J Exp Bot.* 62(3): 1179-1188.

Shore P., Sharrocks A.D. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229: 1-13.

Shulaev V., Sargent D.J., Crowhurst R.N., Mockler T.C., Folkerts O., Delcher A.L., Jaiswal P., Mockaitis K., Liston A., Mane S.P., Burns P., Davis T.M., Slovin J.P., Bassil N., Hellens R.P., Evans C., Harkins T., Kodira C., Desany B., Crasta O.R., Jensen R.V., Allan A.C., Michael T.P., Setubal J.C., Celton J.-M., Rees D.J.G., Williams K.P., Holt S.H., Rojas J.J.R., Chatterjee M., Liu B., Silva H., Meisel L.,

Adato A., Filichkin S.A., Troglio M., Viola R., Ashman T.-L., Wang H., Dharmawardhana P., Elser J., Raja R., Priest H.D., Bryant D.W., Fox S.E., Givan S.A., Wilhelm L.J., Naithani S., Christoffels A., Salama D.Y., Carter J., Girona E.L., Zdepski A., Wang W., Kerstetter R.A., Schwab W., Korban S.S., Davik J., Monfort A., Denoyes-Rothan B., Arus P., Mittler R., Flinn B., Aharoni A., Bennetzen J.L., Salzberg S.L., Dickerman A.W., Velasco R., Borodovsky M., Veilleux R.E., Folta K.M. (2010). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* 43: 109–116.

Smaczniak C., Immink R.G., Angenent G.C., Kaufmann K. (2012a) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139(17): 3081-3098.

Smaczniak C., Immink R.G., Muiño J.M., Blanvillain R., Busscher M., Busscher-Lange J., Dinh Q.D., Liu S., Westphal A.H., Boeren S., Parcy F., Xu L., Carles C.C., Angenent G.C., Kaufmann K. (2012b) Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(5): 1560-1565.

Smith N.A., Singh S.P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P., Green A., Waterhouse P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.

Spolaore S., Trainotti L., Casadoro G. (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *J Exp Bot.* 52(357): 845-50.

Spolaore S., Trainotti L., Pavanello A., Casadoro G. (2003) Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo-beta-1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. *J Exp Bot.* 54(381): 271-277.

Sun L., Sun Y., Zhang M., Wang L., Ren J., Cui M., Wang Y., Ji K., Li P., Li Q., Chen P., Dai S., Duan C., Wu Y., Leng P. (2012a) Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 158(1): 283-298.

Sun L., Yuan B., Zhang M., Wang L., Cui M., Wang Q., Leng P. (2012b) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *SINCE1* increases both lycopene and β -carotene contents in tomato fruit. *J Exp Bot.* 63(8): 3097-3108.

Symons G.M., Chua Y.J., Ross J.J., Quittenden L.J., Davies N.W., Reid J.B. (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot.* 63(13): 4741-4750.

Symons G.M., Davies C., Shavrukov Y., Dry I.B., Reid J.B., Thomas M.R. (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol.* 140: 150–158.

Tadiello A., Pavanello A., Zanin D., Caporali E., Colombo L., Rotino G.L., Trainotti L., Casadoro G. (2009) A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *J Exp Bot.* 60: 651-661.

Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant Physiology. Fourth Edition. *Sinauer Associates, Inc., Publishers.* Sunderland, Massachusetts.

Tandre K., Svenson M., Svensson M.E., Engström P. (1998) Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J.* 15: 615-623.

Theissen G. (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 75-85.

Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J.T., Münster T., Winter K.U., Saedler H. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol.* 42(1): 115-149.

Theissen G., Melzer R. (2007) Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Ann Bot.* 100(3): 603-619.

Theissen G., Saedler H. (2001) Plant biology: floral quartets. *Nature* 409: 469-471.

The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485(7400): 635-641.

Trainotti L., Pavanello A., Casadoro G. (2005) Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *J Exp Bot.* 6(418): 2037-2046.

Trainotti L., Spolaore S., Pavanello A., Baldan B., Casadoro G. (1999) A novel E-type endo-beta-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol Biol.* 40(2): 323-332.

Trainotti L., Tadiello A., Casadoro G. (2007) The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *J Exp Bot.* 58(12): 3299-3308.

Vrebalov J., Pan I., Arroyo A.J.M., McQuinn R., Chung M., Poole M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J., Irish V.F. (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell* 21(10): 3041-3062.

Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Mediano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* 296: 343-346.

- Wang H., Jones B., Li Z., Frasse P., Delalande C., Regad .F, Chaabouni S., Latché A., Pech J.C., Bouzayen M.** (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17(10): 2676-2692.
- Wang H., Schauer N., Usadel B., Frasse P., Zouine M., Hernould M., Latché A., Pech J.C., Fernie A.R., Bouzayen M.** (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell* 21(5): 1428-1452.
- Wang Y.Q., Melzer R., Theissen G.** (2010) Molecular interactions of orthologues of floral homeotic proteins from the gymnosperm *Gnetum gnemon* provide a clue to the evolutionary origin of “floral quartets”. *The Plant J.* 64: 177-190.
- Wang Z.-Y., Ge Y., Scott M., Spangenberg G.** (2004) Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. *American Journal of Botany* 91(4): 523–530.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 7(6): 581-590.
- Wheeler S., Loveys B., Ford C., Davies C.** (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195–204.
- Woolley L.C., James D.J., Manning K.** (2001) Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cell. *Planta* 214: 11–21.
- Zabetakis I., Holden M.A.** (1997) Strawberry Flavour: Analysis and Biosynthesis. *J Sci Food Agric.* 74: 421-434.
- Zhang M., Yuan B., Leng P.** (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J Exp Bot.* 60(6): 1579-1588.
- Zhang P., Tan H.T.W., Pwee K.H., Kumar P.P.** (2004) Conservation of class C function of floral organ development during 300 million years of evolution from gymnosperms to angiosperms. *The Plant J.* 37: 566-577.

Ringraziamenti

Eccomi giunta alla fine di questo percorso formativo. Il dottorato di ricerca ha rappresentato per me un' esperienza professionale importante ma anche una buona "palestra di vita". Sicuramente non si è trattato di un periodo facile e desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnato e che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto.

Un grazie particolare al Prof. Giorgio Casadoro, non solo per avermi permesso di svolgere la tesi nel suo laboratorio, ma anche per avermi seguita ed indirizzata durante tutto il lavoro. Grazie per i preziosi consigli e per aver stimolato la mia curiosità scientifica.

Grazie a Lorella per "avermi indicato la strada" da percorrere per effettuare questa esperienza.

Un grazie sincero ad Anna per essere sempre stata disponibile a rispondere alle mie mille domande quotidiane. Quello che so in merito di strategie di clonaggio e trasformazioni è in gran parte merito tuo. Grazie per aver sempre il sorriso sulle labbra, le tue risate sanno rendere piacevoli anche i momenti più complessi del lavoro!

Grazie ad Alessandro per i preziosi consigli e suggerimenti nel lavoro, ma anche per le chiacchierate soprattutto nell'ultimo anno!

Grazie poi a Nicola, Alice, Rahim e Rossella per aver condiviso con me questa esperienza. Grazie per aver contribuito a rendere piacevole la mia permanenza in laboratorio.

Un importante ringraziamento a Diego della Cooperativa Sant'Orsola, senza le numerose piantine di fragole fornitemi questo lavoro non sarebbe stato possibile!

Infine desidero ringraziare la mia famiglia.

Grazie mamma e papà per avermi appoggiata e sostenuta quando tra mille titubanze ho deciso di intraprendere questo percorso. Senza il vostro costante incoraggiamento non sarei riuscita ad arrivare al termine di questi tre anni. Grazie per essere sempre presenti.

Grazie al "vulcano di casa" Erica. Cosa farei senza i tuoi consigli e le tue continue domande?

Grazia a Matteo, amico e compagno di vita. Grazie per essere sempre al mio fianco.

