

Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXVIII ciclo

(2013-2016)



Tesi di Dottorato

VARIAZIONI FISIOLOGICHE, BIOCHIMICHE E TRASCRITTOMICHE

PER L'ADATTAMENTO ALLO STRESS IDRICO IN POMODORO

PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND TRANSCRIPTOMIC

CHANGES FOR DROUGHT STRESS ADAPTATION IN TOMATO

**Candidato
Dottor
Simone Landi**

**Tutore
Ch.mo Prof.
Sergio Esposito**

**Co-Tutor
Dott.ssa
Maria Stefania Grillo**

**Coordinatore
Ch.mo Prof.
Ezio Ricca**

INDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT..... | 5 |
| CAPITOLO 1: INTRODUZIONE..... | 7 |
| 1.1 PRODUZIONI VEGETALI E STRESS AMBIENTALI..... | 7 |
| 1.2 STRESS IDRICO NELLE PIANTE: MECCANISMI FISIologici E MOLECOLARI DI RISPOSTA | 8 |
| 1.3 GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI (G6PDH): RUOLO NELLA RISPOSTA DELLE PIANTE A STRESS AMBIENTALI | 17 |
| 1.4 ANALISI DEL TRASCrittOMA E RISPOSTA A CONDIZIONI DI STRESS | 19 |
| 1.5 IL POMODORO: IMPORTANZA ECONOMICA E RISPOSTA A STRESS AMBIENTALI | 22 |
| 1.6 SCOPO E CONTENUTO DELLA TESI | 25 |
| CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI | 28 |
| 2.1 ALLEVAMENTO DI PIANTE | 28 |
| 2.1.a Serra..... | 28 |
| 2.1.b Campo..... | 29 |
| 2.1.c Coltura idroponica | 29 |
| 2.2 PARAMETRI FISIologici..... | 30 |
| 2.2.a Conduttanza stomatica e assimilazione fotosintetica | 30 |
| 2.2.b Area fogliare | 31 |
| 2.3 ANALISI DELLA QUALITA' DEI FRUTTI | 31 |
| 2.3.a Polifenoli totali..... | 31 |
| 2.3.b Attività antiossidante..... | 32 |
| 2.3.c Licopene | 32 |
| 2.3.d Beta Carotene | 33 |
| 2.3.e Contenuto in solidi solubili (gradi brix)..... | 33 |
| 2.4 PARAMETRI BIOCHIMICI..... | 34 |
| 2.4.a Determinazione del contenuto in Prolina | 34 |

| | |
|---|----|
| 2.4.b Determinazione del contenuto di Acido Abscissico | 34 |
| 2.5 ANALISI MOLECOLARI..... | 35 |
| 2.5.a Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA | 35 |
| 2.5.b Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA..... | 36 |
| 2.5.c Real-time PCR (qRT-PCR)..... | 36 |
| 2.5.d Sequenziamento NGS | 39 |
| 2.6 ANALISI BIOINFORMATICHE | 40 |
| 2.6.a Trimming delle sequenze grezze | 40 |
| 2.6.b Mapping & Reads Count | 40 |
| 2.6.c Analisi statistica e dei geni diff. espressi..... | 41 |
| 2.6.d Gene Ontology enrichment analysis | 42 |
| 2.6.e Costruzione di Alberi filogenetici..... | 42 |
| 2.7 SAGGI ENZIMATICI E WESTERN BLOTTING | 43 |
| 2.7.a Preparazione dell'estratto grezzo..... | 43 |
| 2.7.b Determinazione delle proteine..... | 43 |
| 2.7.c Determinazione della attività G6PDH | 44 |
| 2.7.d Estrazione HSP70 | 44 |
| 2.7.e Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting..... | 45 |
| CAPITOLO 3: RISULTATI..... | 46 |
| 3.1 STUDIO DEI MECCANISMI FISIologici E MOLECOLARI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN POMODORO | 46 |
| 3.1.1 CARATTERIZZAZIONE BIO-AGRONOMICA DI GENOTIPI DI POMODORO ALLEVATI IN CAMPO..... | 46 |
| 3.1.1.a Analisi della produzione..... | 48 |
| 3.1.1.b Parametri qualitativi dei frutti..... | 49 |
| 3.1.1.c Contenuto in prolina | 53 |
| 3.1.1.d Conservabilità dei frutti | 54 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA A CONDIZIONI DI STRESS IDRICO DI GENOTIPI DI POMODORO ALLEVATI IN CONDIZIONI CONTROLLATE..... | 57 |
| 3.1.2.a Caratterizzazione fisiologica | 59 |
| 3.1.2.b Caratterizzazione biochimica..... | 62 |
| 3.1.3 STUDIO DELLE VARIAZIONI DEL TRASCRIPTOMA IN RISPOSTA A STRESS IDRICO MEDIANTE RNA SEQUENCING | 66 |
| 3.1.3.a Analisi bioinformatiche dei risultati di RNA sequencing | 67 |
| 3.1.3.b Identificazione e analisi dei geni differenzialmente espressi..... | 71 |
| 3.1.3.c Validazione dei risultati di RNA-seq | 77 |
| 3.1.3.d Analisi di arricchimento Gene Ontology..... | 78 |
| 3.1.3.e Analisi dei pathway metabolici coinvolti nella risposta a stress | 81 |
| 3.1.3.f Analisi della famiglia genica LEA di <i>Solanum lycopersicum</i> | 90 |
| 3.2 STUDIO DEL RUOLO DELL'ENZIMA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI IN RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO | 93 |
| 3.2.1 CARATTERIZZAZIONE (FISIOLOGICA, BIOCHIMICA E MOLECOLARE) DELLA RISPOSTA A STRESS IDRICO DI BREVE E LUNGA DURATA IN POMODORO | 94 |
| 3.2.2 IDENTIFICAZIONE DI SEQUENZE GENICHE DI G6PDH IN POMODORO..... | 100 |
| 3.2.3 G6PDH E RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN POMODORO | 103 |
| CAPITOLO 4: DISCUSSIONE | 107 |
| 4.1 MECCANISMI FISIOLOGICI E MOLECOLARI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN VARIETÀ TRADIZIONALI DI POMODORO..... | 109 |
| 4.2 STUDIO DEL RUOLO DELL'ENZIMA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI IN RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO | 120 |
| CAPITOLO 5: BIBLIOGRAFIA | 125 |
| CAPITOLO 6: RINGRAZIAMENTI | 145 |

ABSTRACT

Drought is one of the major abiotic stresses affecting plant growth and productivity. The ability of plants to tolerate drought is crucial for agricultural productivity worldwide. The necessity to improve this trait is becoming increasingly urgent as climate change scenarios predict an increase in aridity and the water resources for agricultural practices already represent a major limitation. Tomato (*Solanum lycopersicum*), a major crop in the Mediterranean basin, is widely cultivated in Southern Italy, where is subjected to abiotic stresses and requires constant and high input of water resources to meet productivity and fruit quality standards. Interestingly within the available rich Italian tomato germplasm there are some local ecotypes well adapted to dry environments whose potential as source of superior adaptive alleles has never been fully exploited. In order to dissect the complexity of the molecular events occurring in response to drought we pursued an integrated approach where several biochemical and physiological parameters were evaluated together with transcriptome sequencing in various landraces from the Campania Region. Plants were grown in greenhouse and in open field condition and subjected to prolonged drought for yield, fruit quality, physiological, molecular and biochemical characterization. Two landraces (Crovarese and Lucariello) were then selected for an RNA-sequence approach to identify genes involved in drought stress response and adaptive mechanisms. Using RNA sequencing on leaf samples, we identified 2851 and 1867 genes up-regulated upon stress in Crovarese and Lucariello, respectively. Furthermore, 4000 genes were found down-regulated in Crovarese and 2642 in Lucariello. Extensive overlapping was observed, with 1419 up- and 2297 down-regulated genes common to both genotypes. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes allowed the discovery of the main processes regulated in response to drought and among those, the photosynthesis pathway, LEA proteins family, the regulation of cell wall organization were then selected for a further investigation at bioinformatics level. In a separate set of experiments the study focused on Glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH) for an in deep characterization at enzymatic and transcriptional level of this enzyme during drought. Results show a significant increase in G6PDH activity, expression and occurrence of cytosolic isoform (cy-G6PDH) in tomato upon drought. The study showed for the first time the central role of this enzyme in tomato response to water deficit by providing reducing power to counteract the effects of ROS accumulation in response to drought.

ABSTRACT

La siccità è lo stress ambientale che limita maggiormente la crescita e la produttività delle piante. La capacità delle piante di tollerare la carenza idrica è un aspetto cruciale per la produttività agricola a livello mondiale; infatti il mantenimento di standard produttivi elevati anche in condizioni di stress idrico è un obiettivo prioritario e urgente anche considerando i cambiamenti climatici, l'aumento delle regioni aride e della disponibilità d'acqua che già rappresenta una risorsa limitante l'agricoltura.

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle principali specie coltivate nel bacino del Mediterraneo, soprattutto nel Sud Italia dove è soggetto a diversi stress ambientali e necessita di un continuo input idrico per garantire elevate rese produttive e qualità dei frutti. Tra le collezioni di germoplasma italiano, sono presenti diversi ecotipi locali adattati a condizioni di siccità le cui potenzialità come fonte di alleli superiori non sono state mai pienamente utilizzate per sviluppare nuove varietà tolleranti.

Per studiare la complessità degli eventi molecolari che si verificano in risposta allo stress idrico, è stato utilizzato un approccio integrato in cui sono stati valutati parametri fisiologici e biochimici insieme a uno studio del trascrittoma in diverse *landraces* della regione Campania. Piante di pomodoro sono state allevate in serra e in campo e sottoposte a condizioni di stress idrico prolungate per una caratterizzazione biochimica, fisiologica, molecolare, qualitativa dei frutti e della produttività. In particolare due ecotipi (Crovarese e Lucariello) sono stati selezionati per un approccio *RNA-sequencing* per identificare i geni di risposta allo stress idrico coinvolti nei meccanismi di adattamento. Sono stati identificati 2851 e 1867 geni up-regolati e 4000 e 2642 geni down-regolati in condizioni di stress, in Crovarese e Lucariello rispettivamente. Molti geni sono risultati essere differenzialmente espressi in entrambi i genotipi (1419 geni up- e 2297 geni down-regolati). L'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) sui geni differenzialmente espressi ha permesso di identificare i principali processi regolati in risposta allo stress idrico. Tra questi il *pathway* della fotosintesi, la famiglia delle proteine LEA e la regolazione dell'organizzazione della parete cellulare, sono stati selezionati per un ulteriore approfondimento a livello bioinformatico.

Parallelamente è stata sviluppata una linea di ricerca focalizzata sulla caratterizzazione a livello biochimico e molecolare della Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH, EC.1.1.1.49) di pomodoro in risposta a carenza idrica. I risultati hanno evidenziato un significativo aumento dell'attività enzimatica totale, e dei livelli proteici e di espressione della G6PDH citosolica (cy-G6PDH) in risposta a condizioni di stress. Lo studio ha mostrato per la prima volta in pomodoro il ruolo di questo enzima nella risposta al deficit idrico per la fornitura di potere riducente per contrastare l'effetto ossidativo dei ROS.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 PRODUZIONI VEGETALI E STRESS AMBIENTALI

Le piante, in quanto organismi sessili, sono soggette continuamente a condizioni ambientali non ottimali indotte da stress di diverso tipo. Tali stress possono derivare da cause biotiche e abiotiche. Stress di tipo biotico sono generati da organismi viventi (funghi, batteri, insetti, ecc.) mentre stress di tipo abiotico sono causati da fattori legati ad eccessi o carenze di tipo chimico-fisico dovuti alle condizioni ambientali. La crescita delle piante in ambienti ostili o sottoposti a stress abiotici si riflette da un punto di vista agronomico ad un calo della produttività e di conseguenza ad un danno economico (Boyer, 1982). Si stima che solo il 10% della superficie coltivata nel mondo non è soggetta a condizioni di stress, mentre il restante 90%, con diversa intensità, può essere soggetta a stress singoli o combinazioni di stress. Tra questi circa il 26% dei suoli coltivati sono interessati da carenza idrica, il 15% da basse temperature, il 20% da carenza o eccesso di sali minerali e ioni nel terreno (Christiansen, 1982). Questa problematica è attualmente esacerbata dalle prospettive dei cambiamenti climatici in corso che richiedono una revisione delle strategie di utilizzo delle risorse naturali e di approcci innovativi per la costituzione di varietà resistenti le condizioni di stress ambientali non sempre prevedibili. Infatti a causa del presumibile aumento della popolazione mondiale e della concomitante imprevedibilità delle condizioni ambientali, lo sviluppo di tecnologie agronomiche innovative che permettano un ottimizzazione della gestione delle risorse (suolo, acqua) e la selezione di varietà di piante coltivate con una migliore adattabilità a ridotti input idrici, rappresentano i

principali obiettivi della ricerca nel settore al fine di garantire la sostenibilità futura della agricoltura (Eckardt *et al.*, 2009).

Tradizionalmente i metodi di miglioramento genetico, basati sull'utilizzazione della variabilità genetica esistente, dell'ibridazione interspecifica e intergenerica, delle mutazioni indotte e della variabilità somaclonale hanno avuto un limitato successo nell'ottenimento di piante resistenti o tolleranti gli stress ambientali (Flowers & Yeo, 1995). Questo è dovuto principalmente alla complessità dei caratteri correlati alla tolleranza allo stress, alla bassa variabilità genetica delle componenti legate alla produzione in condizioni di stress ambientali e alla mancanza di efficienti tecniche di selezione (Ribaut *et al.*, 1997).

I moderni approcci di genetica, biologia molecolare e genomica, insieme con l'utilizzo delle tecnologie bioinformatiche recentemente sviluppate, stanno già dando un contributo significativo alla comprensione dei complessi meccanismi di risposta a condizioni ambientali non ottimali individuando i network genici che si attivano durante l'adattamento/tolleranza, conoscenze indispensabili per lo sviluppo di nuove strategie di miglioramento genetico per la produzione di varietà tolleranti (Varshney *et al.*, 2015).

1.2 STRESS IDRICO NELLE PIANTE: MECCANISMI FISILOGICI E MOLECOLARI DI RISPOSTA

Il deficit idrico è il singolo stress con maggiore impatto sulla produttività delle specie agrarie. L'acqua è la risorsa più importante per l'agricoltura globale tanto che attualmente non meno del 75 % dell'acqua potabile mondiale è utilizzata in agricoltura

(Wallace, 2000). E' stato stimato inoltre che i cambiamenti climatici indurranno un aumento della siccità che porterà alla riduzione della produzione di mais in USA tra il 15% e il 30% (Lobell *et al.*, 2014). La condizione di stress idrico si manifesta in maniera graduale, con un progressivo abbassamento della disponibilità d'acqua presente nel terreno, dovuto a scarse precipitazioni atmosferiche. Alternativamente condizioni di stress idrico possono verificarsi anche in modo cronico dovute ad un eccesso di sali nel terreno o in maniera improvvisa, indotte da condizioni di congelamento (Zhu, 2002). A livello citologico il deficit idrico induce disidratazione cellulare e conseguentemente, concentrazione dei soluti, cambiamenti nel volume della cellula e nella forma del plasmalemma, diminuzione del gradiente idrico interno, perdita del turgore e dell'integrità di membrana e, infine, denaturazione proteica (Ingram & Bartels, 1996). A livello fisiologico la carenza idrica attiva nelle foglie la chiusura degli stomi per evitare un'ulteriore perdita di acqua e questo riduce la capacità di fotosintesi. In genere tali risposte sono particolarmente complesse e causano una riduzione della crescita e della produttività, alterando lo sviluppo dei meristemi, di fiori e frutti e i processi riproduttivi.

Le piante hanno sviluppato un'ampia varietà di strategie per adattarsi alle mutevoli condizioni ambientali. Negli ultimi anni, diversi approcci sperimentali hanno consentito l'identificazione e la caratterizzazione di un elevato numero di geni e funzioni geniche coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante a stress idrico e allo stress osmotico ad esso associato (Bohnert *et al.*, 2006; Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Analisi trascrittomiche su larga scala hanno evidenziato che centinaia di geni sono attivati o repressi in risposta a stress idrico ed osmotico (Bray, 2004; Seki *et al.*, 2004). I numerosi geni individuati sono in grado di proteggere le cellule vegetale dallo stress

idrico sia in maniera diretta con la sintesi di acido abscissico (ABA), l'accumulo di vari osmoliti (prolina e mannitolo), la sintesi di proteine di riparazione e protezione (Cushman *et al.*, 2000), sia in maniera indiretta essendo coinvolti nei meccanismi di regolazione della percezione e trasduzione del segnale di stress (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Leone *et al.*, 1999). La tolleranza allo stress idrico è quindi il risultato del coordinamento di profonde modificazioni biochimiche, fisiologiche e molecolari finalizzate alla riduzione della perdita d'acqua, alla protezione della funzionalità cellulare, al ripristino dell'omeostasi ionica, alla riparazione dei danni e alla costituzione di un nuovo equilibrio compatibile con le condizioni di stress.

Di seguito una descrizione delle principali classi di composti e proteine coinvolte nella risposta allo stress.

Soluti e osmoliti compatibili

In condizioni di carenza idrica le cellule accumulano soluti al fine di bilanciare l'osmoregolazione cellulare così da aumentare la pressione osmotica intracellulare, evitare la perdita di acqua e mantenere il turgore cellulare. Tali soluti includono ioni come K^+ , Na^+ e soluti organici, quali composti dell'ammonio quaternario (glicinbetaina), amminoacidi (prolina), polioli (inositolo, mannitolo) e zuccheri (saccarosio, trealosio), chiamati anche osmoliti compatibili perché si accumulano in quantità elevate nel citoplasma non interferendo con le normali funzioni cellulari.

Geni codificanti per enzimi coinvolti nella biosintesi degli osmoliti sono stati isolati da diverse specie vegetali e micro-organismi, che condividono con le piante alcuni meccanismi osmoprotettivi. Negli ultimi anni la manipolazione dei livelli di osmoliti mediante approcci di ingegneria genetica è stata oggetto di numerose ricerche

(Wang *et al.*, 2003; Vinocur e Altman, 2005). Ad esempio piante transgeniche di patata esprimenti il gene codificante per la *betaine aldehyde dehydrogenase* (BADH) di spinacio sottoposta al controllo di un promotore inducibile di *Arabidopsis thaliana* hanno mostrato un aumento della crescita dopo l'induzione di stress da NaCl e idrico (Zhang *et al.*, 2011). Ulteriori esperimenti condotti sull'enzima $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS1), uno dei componenti principali della via biosintetica della prolina, hanno indicato in piante di *Arabidopsis* deficitarie di tale enzima, che la sintesi della prolina è necessaria per mantenere la crescita delle piante in regime di ridotta disponibilità idrica (Sharma *et al.*, 2011).

Proteine canale e trasportatori di ioni

Un'altra classe di proteine con ruolo cruciale per ridurre le perdite di acqua sono i trasportatori; proteine che facilitano il movimento dell'acqua attraverso le membrane, come le acquaporine e diverse pompe ioniche, quali ATPasi, proteine antiporto Na^+/H^+ e trasportatori del K^+ . Le acquaporine (*water channel proteins*) sono proteine canale che facilitano il passaggio dell'acqua attraverso le membrane, regolando la conduttività idraulica delle membrane (Maurel & Chrispeels, 2001).

Molti geni codificanti per acquaporine sono sovraespressi in risposta a stress idrico, tra questi RD28 in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992) e TRAMP (*tomato-ripening-associated membrane protein*) (Fray *et al.*, 1994). Altri trasportatori consentono il mantenimento dell'omeostasi ionica cellulare, mediante regolazione dell'assorbimento, del sequestro, della esclusione e del trasporto ionico in condizioni di stress. Grazie a questa regolazione, nella cellula è prontamente ristabilito un rapporto equilibrato K^+/Na^+ e mantenuta una bassa concentrazione citosolica di Na^+

(Zhu, 2003). In questa classe proteica sono note differenti sottofamiglie a seconda della localizzazione delle proteine come le: *plasma membrane intrinsic protein* (PIPs), *tonoplast intrinsic proteins* (TIPs), *nodulin-26 like intrinsic protein* (NIPs), *small basic intrinsic proteins* (SIPs) e *X intrinsic proteins* (XIPs) (Danielson & Johanson, 2008). La famiglia PIP in particolare è stata ben caratterizzata come fattore di risposta a condizioni di carenza d'acqua. Mutanti di *Arabidopsis* in grado di degradare specificamente le acquaporine *PIPs2;1* inibendone l'attività di trasporto, esibiscono un aumento sensibile della resistenza a *drought* (Jang *et al.*, 2004; Alexanderson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009). Al contrario un'altra classe di PIPs di banana (*Musa acuminata*) risulta essere sovraespressa in condizioni di stress idrico e piante di *Arabidopsis* trasformate con il gene *MaPIP1* mostrano un aumento della resistenza allo stress idrico (Xu *et al.*, 2014). Questa classe di acquaporine quindi presenta funzioni divergenti in risposta alla siccità, molto probabilmente associate a ruoli differenti delle varie proteine PIP.

Situazione analoghe sono state riscontrate anche in tabacco dove è stata riscontrata la presenza sia di geni che diminuiscono la loro attività in presenza di stress idrico (*NtPIP1;1*, *NtPIP2;1*) sia la presenza di geni la cui espressione risultata aumentata (*NtAQP1*) (Mahdie *et al.*, 2008).

Enzimi detossificanti i ROS

La carenza idrica, come altri tipi di stress ambientali, favorisce inoltre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), il cui eccessivo accumulo induce una serie di danni cellulari, che se non efficientemente bilanciati, possono causare la morte cellulare (Smirnoff, 1993). Per rispondere efficacemente allo stress ossidativo dovuto

all'eccesso di ROS le cellule sintetizzano composti antiossidanti ed enzimi detossificanti, quali la superossido-dismutasi, la glutatione S-transferasi, la ascorbato-ossidasi e la catalasi (Scandalios, 1997). Negli ultimi anni sono stati pubblicati molti lavori riguardanti l'ottenimento di piante tolleranti mediante la sovra-espressione di enzimi antiossidanti. Ad esempio piante di riso overesprimenti il gene *OsMT1 α* , codificante per una Superossido dismutasi, hanno mostrato un miglioramento della tolleranza allo stress idrico con contemporaneo aumento dell'attività della catalasi e dell'ascorbato perossidasi (Yang *et al.*, 2009). Similmente la sovra-espressione dell'ascorbato perossidasi in cloroplasti di tabacco induce resistenza a deficit idrico e stress salino (Badawi *et al.*, 2004). Infine anche modifiche nel metabolismo del glutatione hanno mostrato essere di interesse per la risposta a stress. In particolare piante di tabacco overesprimenti il gene Glutathione S-transferase di *Prosopis juliflora* (*PjGSTU1*) sopravvivono meglio rispetto piante controllo in condizione di stress idrico indotto da Polietilenglicole (PEG) (George *et al.*, 2010).

Degradazione e folding proteico

In risposta a stress idrico si accumulano, inoltre, anche enzimi coinvolti nella degradazione di proteine danneggiate irreparabilmente dagli effetti dello stress osmotico, come l'ubiquitina e alcune proteasi (Guerrero *et al.*, 1990). Attività opposta hanno invece gli inibitori di proteasi e le chaperonine, anch'esse indotte in risposta a questo tipo di stress. Mentre la produzione di inibitori di proteasi sembra avere il ruolo di proteggere le proteine dalle proteasi rilasciate a causa di danni nelle membrane intracellulari, le chaperonine sono direttamente coinvolte nel favorire il

corretto ripiegamento ed assemblaggio di proteine, processo disturbato da condizioni di stress idrico ed osmotico (Stone, 2014; Kosova *et al.*, 2015).

ABA e etilene

Di estrema importanza è il ruolo di mediatore della risposta a stress svolto da alcuni fitoregolatori vegetali come l'acido abscissico (ABA) e l'etilene. L'ABA svolge un ruolo importante nella risposta adattativa a condizioni ambientali di stress, ma al tempo stesso è fondamentale per lo sviluppo della pianta partecipando a diversi processi come la maturazione dei semi, la dormienza e la senescenza (Finkelstein 2013; Miyazawa *et al.*, 2013). Le reazioni precoci delle piante sottoposte a stress idrico sono mediate da un incremento dei livelli di ABA che induce l'espressione di numerosi geni e la chiusura degli stomi migliorando la resistenza allo stress idrico e riducendo la traspirazione nelle foglie (Shinozaki *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2011). È stato recentemente dimostrato che l'ABA si lega a un recettore intracellulare, PYR/RCAR coinvolto nel controllo della fosforilazione/defosforilazione di proteine chinasi SnRK2, che regolano la trascrizione di geni ABA-dipendenti. La stessa chinasi SnRK2, fosforilando proteine trasportatrici di ioni, induce la chiusura dei canali ionici presenti sulle membrane delle cellule di guardia favorendo la chiusura degli stomi e quindi riducendo la traspirazione fogliare.

Gli step limitanti la sintesi di ABA sono catalizzati dagli enzimi *Zeaxantina Epossidasi* (ZEP) che converte il carotenoide zeaxantina in tutto-trans violaxantina (Finkelstein, 2013), e *9-cis-epoxycarotenoid dioxigenasi* (NCED) che catalizza la sintesi di xantoxina. La sovra-espressione dei geni ZEP e NCED induce l'aumento dei livelli di ABA e una riduzione della traspirazione nelle foglie con un conseguente aumento della tolleranza alla siccità (Park *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2000; Iuchi *et al.*, 2001;). Anche l'etilene è un importante

fitoregolatore vegetale, essendo coinvolto in numerose funzioni come la maturazione dei frutti, lo sviluppo dei germogli e la senescenza fogliare. In condizioni di stress idrico l'aumento dei livelli di ABA limita la produzione di etilene (Sharp, 2002). L'enzima limitante la biosintesi dell'etilene è l'*1-aminocyclopropano 1-carboxy acido sintasi* (ACS). Piante transgeniche in cui viene eliminata l'espressione della ACS mostrano un ritardo della senescenza fogliare indotta dallo stress idrico associata ad un aumento della conduttanza stomatica (Young *et al.*, 2004).

Proteine Late Embryogenesis Abundant (LEA)

Un ulteriore processo di risposta allo stress idrico è quello finalizzato alla protezione delle strutture cellulari e riparo dei danni (Close *et al.*, 1989; Gilmour *et al.*, 1992; Almoguera *et al.*, 1993). Le proteine LEA sono state identificate per la prima volta in semi di cotone (*Gossypium hirsutum*) (Dure *et al.*, 1981), e successivamente sono state trovate in diverse altre piante, nelle quali a seconda di domini e composizione amminoacidica sono classificate in sottofamiglie differenti (Dure *et al.*, 1989; Tunnacliffe & Wise, 2007). Le proteine LEA presentano una composizione amminoacidica ricca in glicina e sono altamente idrofiliche. Spesso si presentano conformazionalmente non strutturate e tendono a diventare funzionalmente attive solo all'occorrenza (Tunnacliffe & Wise, 2007). È stato ipotizzato che i membri della famiglia delle proteine LEA possono svolgere la loro funzione di risposta allo stress idrico agendo in modo differente: come chaperonine per prevenire ripiegamenti errati e impedire la denaturazione proteica mantenendo le proteine citoplasmatiche nel corretto folding (Xiong & Zhu, 2002), come scudo molecolare e stabilizzatori delle membrane citoplasmatiche proteggendo dalla degradazione proteine strutturali,

enzimi ed elementi della membrana plasmatica (Tunnacliffe & Wise, 2007), oppure sequestrando ioni metallici in eccesso all'interno del citoplasma (Svensson *et al.*, 2000). La sovra-espressione dei geni LEA migliora la tolleranza agli stress osmotici in piante transgeniche, lieviti e batteri (Houde *et al.*, 2004; Liu & Zheng, 2005; Liu *et al.*, 2010; Duan & Cai, 2012). L'espressione del gene HVA1 di orzo in piante di frumento ha consentito l'aumento della resistenza allo stress idrico (Xu *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 2000) mentre la sovra-espressione dei geni PMA80 e PMA1959 di frumento ha indotto in piante di riso l'aumento della tolleranza alla disidratazione (Cheng *et al.*, 2002).

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

Sono invece numerosi i geni descritti come codificanti per fattori coinvolti nelle fasi successive di trasduzione del segnale di stress. Un ruolo di importanza primaria nella trasduzione del segnale di stress è svolto da una serie di chinasi e fosfatasi attraverso fosfo-defosforilazione di fattori trascrizionali (Mizoguchi *et al.*, 1997). Inoltre, nelle

piante sono stati descritti sistemi di MAP-chinasi specificamente attivi in condizioni di stress osmotici (Munnik & Meijer, 2001).

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

1.3 GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI (G6PDH): RUOLO NELLA RISPOSTA DELLE PIANTE A STRESS AMBIENTALI

L'enzima *Glucosio 6 fosfato deidrogenasi* (G6PDH) potrebbe rappresentare il primo enzima e principale regolatore del ciclo ossidativo dei pentosi fosfati catalizzando la reazione limite del ciclo sia negli animali che nelle piante. La via del pentoso fosfato (Oxidative Pentose Phosphate Pathway - OPPP) è un processo metabolico primario la cui funzione principale è quella di generare il cofattore ridotto NADPH (Castiglia *et al.*, 2015), usato nei processi biosintetici, come la sintesi degli acidi grassi (Hutchings *et al.*, 2005) e l'assimilazione del nitrato (Bowsher *et al.*, 1989). Questa via, inoltre, fornisce il ribosio-5P (Ri5P), necessario per la sintesi degli acidi nucleici, e l'eritrosio-4P (E4P), necessario per la produzione di numerosi composti aromatici nel percorso metabolico dello scchimato, parte integrante della sintesi delle basi azotate, aminoacidi aromatici e loro derivati (Kruger & von Schaewen, 2003). Il ciclo dell'OPPP è caratterizzato da una prima parte irreversibile, definita fase ossidativa, durante la quale si ha la riduzione di due molecole di NADPH e la liberazione di una molecola di CO₂ a partire

dal glucosio-6P (G6P). La prima reazione della OPPP è catalizzata dalla G6PDH (EC11.1.49): il G6P viene ossidato a 6-fosfoglucono- δ -lattone, in concomitanza con la riduzione del NADP^+ in NADPH.

L'attività e l'espressione della G6PDH sono modulate da una serie di fattori come la luce, il NADPH e i composti riducenti. Proprio il NADPH è un inibitore di tipo competitivo per tutte le isoforme G6PDH vegetali finora studiate (Wendt *et al.*, 2000); questi interagisce con il sito di legame del NADP^+ , rendendolo meno disponibile per il substrato. Tale ipotesi è sostenuta dal fatto che quest'ultimo può essere rimosso dal sito con aggiunta di NADP^+ , infatti l'effetto inibitorio aumenta durante l'esposizione alla luce, quando aumenta il rapporto $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Esposito *et al.*, 2001). È stato ormai dimostrato che nelle piante superiori sono presenti almeno tre isoforme della G6PDH: citosolica (cy-G6PDH), cloroplastica (P1 - G6PDH) e plastidiale (P2 - G6PDH) che mostrano differenti parametri cinetici e giocano un differente ruolo nel metabolismo della pianta (Kruger & von Schaewen, 2003).

La presenza delle diverse isoforme è stata confermata dal punto di vista molecolare (Graeve *et al.*, 1994; von Schaewen *et al.*, 1995; Wendt *et al.*, 2000), genomico (Wakao & Benning, 2005), e mediante Western-blotting con l'utilizzo di anticorpi specifici (Wendt *et al.*, 2000; Esposito *et al.*, 2005). In particolare la G6PDH citosolica rappresenta la maggior parte dell'attività totale misurata (60-85%) ed è stato suggerito che questa isoforma sia coinvolta nel sostentamento del metabolismo basale (Esposito *et al.*, 2001; 2005). Al contrario l'attività G6PDH compartimentata rappresenta il 15-20% del totale ed è probabilmente coinvolta nel metabolismo azotato e nei processi di morfogenesi (Esposito *et al.*, 2001; 2005). Diversi studi dimostrano che esiste una correlazione tra il ciclo dell'OPPP e la risposta della pianta a condizioni di stress come

carenza di nutrienti ed elevata salinità (Nemoto & Sasakuma, 2000; Esposito *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008, Cardi *et al.*, 2015). L'accumulo intracellulare di ABA, come segnale di stress, influenza la regolazione di una serie di geni tra cui la G6PDH. Elementi ABRE (ABA responsive elements) sono stati identificati anche sul promotore dell'isoforma P2-G6PDH di riso (Hou *et al.*, 2006), e anche in orzo si registra un aumento dell'attività e dell'accumulo della P2-G6PDH in seguito all'aggiunta di ABA (Cardi *et al.*, 2010). Per quanto riguarda il ruolo della G6PDH e lo stress idrico alcuni studi preliminari hanno evidenziato che la G6PDH è coinvolta nella formazione di NADPH per mantenere elevati livelli di glutatione e ascorbato per contrastare l'accumulo di H₂O₂ in piante di soia sottoposte a stress idrico (Liu *et al.*, 2012).

1.4 ANALISI DEL TRASCRIPTOMA E RISPOSTA A CONDIZIONI DI STRESS

Nell'ultimo decennio le ricerche e gli studi sulla complessità dei meccanismi della tolleranza e delle risposte a stress nelle piante, sono stati affrontati con strumenti di analisi e di studio integrati, capaci di fornire una visione globale della complessa regolazione dell'intero set di geni coinvolti. Le nuove risorse genomiche e le tecnologie di ultima generazione per il sequenziamento e l'analisi del genoma e della sua espressione stanno contribuendo sotto molti aspetti alla dissezione molecolare dei caratteri quantitativi. L'identificazione dei geni coinvolti nei meccanismi di risposta e tolleranza a stress abiotici può essere definita in base alla loro espressione differenziale in risposta allo stress assumendo che l'attivazione di questi geni sia parte della risposta a stress in qualche modo associata con la capacità della cellula di adattarsi o tollerare condizioni di stress (Bray, 2000). Lo studio della risposta agli stress

abiotici non può ormai prescindere da un'analisi approfondita delle modificazioni trascrittomiche che sopraggiungono al manifestarsi di condizioni ambientali ostili, come ampiamente dimostrato dalle migliaia di geni individuati recentemente in diverse specie vegetali di interesse e coinvolti in differenti funzioni cellulari con ruolo chiave nei meccanismi di risposta a breve e/o a lungo termine alla base dell'adattamento /tolleranza alla condizione di stress imposto (Avramova *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Iovieno *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 2016). Storicamente l'identificazione dei geni coinvolti nella risposta a stress è stata effettuata utilizzando diverse tecnologie come *Differential display*, *qRT-PCR*, *AFLP* e soprattutto *microarray*. In passato queste tecnologie si sono rivelate molto utili nell'identificazione di geni coinvolti in diverse condizioni di stress e nella costruzione di *network* genici che cooperano nella risposta cellulare come ad esempio nell'identificazione di circa 8000 geni in *Arabidopsis* coinvolti nella risposta a stress idrici, salini da elevate temperature (Seki *et al.*, 2002; Kreps *et al.*, 2002). Seppur utili però queste tecnologie non bastano più per indagare le basi molecolari della risposta a stress.

Recentemente sempre più lavori scientifici hanno adottato le tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) per applicazioni trascrittomiche in piante di interesse agrario mediante RNA-Sequencing (Marcolino-Gomes *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015; Iovieno *et al.*, 2016;). Il 2008 si può considerare come anno di transizione per il passaggio dall'utilizzo dei *microarray* all'RNA-seq per analisi trascrittomiche, questa tecnica consente di identificare geni differenzialmente espressi tra due condizioni decise dallo sperimentatore con una risoluzione migliore rispetto ai *microarray* (Ledford, 2008; Fu *et al.*, 2009). Inoltre l'RNA-seq permette di studiare lo

splicing alternativo (Wang *et al.*, 2008), la presenza di trascritti sconosciuti (Core *et al.*, 2008), il comportamento di *noncoding* e *long noncoding* RNA (Wilhelm *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2015), l'analisi di modificazioni epigenetiche e anche analisi di intere comunità microbiologiche (metagenomica). Attualmente sono disponibili numerose piattaforme di sequenziamento, tutte in grado di analizzare milioni di corti frammenti di DNA, chiamati *read*, in una singola corsa di sequenziamento. La lunghezza delle *read* dipende dal tipo di piattaforma NGS utilizzata, ma solitamente oscilla dalle 25 alle 450 paia di basi. Questa lunghezza è sicuramente inferiore a quella dei frammenti sequenziati attraverso il classico metodo Sanger, ma la quantità di informazione ottenuta, circa 50 gigabasi per corsa di sequenziamento, è sufficiente per applicazioni genomiche e trascrittomiche (Nowrousian, 2010). A livello tecnico la realizzazione di un corretto esperimento di RNA-seq prevede inizialmente l'estrazione di RNA, la conversione in cDNA e il successivo utilizzo di una delle diverse tecnologie NGS per il sequenziamento delle librerie di cDNA (Van Verk *et al.*, 2013). Una volta ottenuti i dati di sequenza grezzi, sono previsti una serie di step computazionali per l'ottenimento dei risultati finali.

Tra le nuove potenzialità offerte dagli studi di genomica e trascrittomica delle piante, una delle strategie più potenti per l'identificazione dei meccanismi di regolazione genetica in fenotipi di interesse è la trascrittomica comparativa, che permette di identificare i profili di espressione di un gran numero di geni su genotipi e/o trattamenti a confronto. Associata all'analisi RNA-seq è oggi possibile effettuare un'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO). Per categoria GO si intende una serie di termini standardizzati che descrivono la funzione molecolare, il processo biologico e la componente cellulare di un particolare gene (Ashburner *et al.*, 2000). Analisi di questo

tipo attualmente sono molto utilizzate come strumento per varie applicazioni in esperimenti di sequenziamento NGS (Schmidt *et al.*, 2014). Pertanto l'utilizzo di strumenti di analisi trascrittomiche mediante NGS associati a progetti di sequenziamento di nuove specie vegetali sono sempre più auspicabili per finalità di ricerca in campo bio-agronomico.

1.5 IL POMODORO: IMPORTANZA ECONOMICA E RISPOSTA A STRESS AMBIENTALI

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle specie coltivate più importanti a livello mondiale posizionandosi al sesto posto per valore economico tra le diverse specie agrarie coltivate (Tab. 1). Soprattutto nel nostro paese il pomodoro è una risorsa economica molto importante in quanto l'Italia è attualmente l'ottavo produttore mondiale sia per il consumo fresco che come prodotto trasformato (FAOstat 2013).

Tabella 1: Lista delle principali colture prodotte globalmente classificate per valore commerciale (FAOstat 2013).

| Principali colture | Produzione (1000\$ Int) |
|--------------------|-------------------------|
| Riso | 1,91E+21 |
| Grano | 8,59E+20 |
| Soia | 6,95E+20 |
| Mais | 6,71E+19 |
| Canna da zucchero | 6,08E+20 |
| Pomodoro | 5,99E+20 |
| Patata | 4,95E+20 |
| Uva | 4,41E+20 |
| Cotone | 3,51E+20 |
| Mela | 3,39E+20 |
| Banana | 2,97E+20 |
| Manioca | 2,72E+20 |
| Mango | 2,59E+20 |
| Palma da olio | 2,37E+20 |

Il pomodoro è stato domesticato in Messico (Tanksley, 2004) e dopo la sua introduzione in Europa ha trovato un enorme successo nei paesi del mediterraneo, come Spagna e Italia, nei quali si è formato un secondo centro di diversificazione della specie (García-Martínez *et al.*, 2006). Nel nostro paese viene coltivato soprattutto nel meridione e in Campania, e proprio in queste regioni la sua importanza economica è ancora maggiore in quanto diverse varietà tipiche hanno guadagnato la denominazione d'origine protetta (DOP).

Attualmente è una delle specie vegetali più studiate a livello genetico e genomico, non solo a causa della sua notevole importanza economica, ma anche perché possiede un genoma relativamente piccolo (950Mb), completamente sequenziato (*The Tomato Genome Consortium*, 2012), che contribuisce a farne un sistema modello anche per diverse specie oltre che per la famiglia delle *Solanacee*. L'utilizzo delle risorse genomiche di pomodoro verrà ulteriormente migliorato a seguito dell'alto numero di progetti di sequenziamento e *resequencing* che sono stati recentemente pubblicati utilizzando sia specie selvatiche di pomodoro come *Solanum pennelli* (Bolger *et al.*, 2014) sia varietà locali italiane come San Marzano o Pomodoro Vesuviano (Ercolano *et al.*, 2014). Ulteriori progetti di *resequencing* sono attualmente in corso anche per le varietà tradizionali campane da serbo (dato non pubblicato).

Le piante di pomodoro sono particolarmente suscettibili agli stress abiotici di vario tipo. Ad esempio, durante la fase di fioritura e allegagione le piante di pomodoro sono suscettibili a stress da elevate temperature. In generale, solo poche ore di trattamento ad elevate temperature (sopra i 40°C), allo stadio critico della gametogenesi, possono influenzare in maniera irreparabile la vitalità degli ovuli, la deiscenza e il trasferimento del polline (Rudich *et al.*, 1977) e quindi la produzione. Si stima che dal 30% al 100% del prodotto commerciabile di pomodoro è perso a causa di repentini ed imprevedibili cambiamenti di

temperatura poiché alte temperature notturne (maggiori dei 26°C) o diurne (maggiori di 40°C) e basse temperature notturne (più basse dei 10°C), sono la più frequente causa di danno alla gametogenesi e alla fecondazione in campo. Anche lo stress salino influenza in una certa misura la crescita, lo sviluppo e la produzione di piante di pomodoro. Le varietà classicamente selezionate per l'industria presentano una scarsa resistenza allo stress salino, risultante dalle strategie di breeding che preferivano incrementare la produzione in piante cresciute in ambienti ottimali (Villalta *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il fabbisogno idrico in campo del pomodoro, questo è piuttosto elevato, essendo di circa 400-600 mm di acqua entro un periodo di 75-125 giorni dall'inizio dell'allegagione ed i metodi di irrigazione a goccia sono ampiamente utilizzati (Zegbe *et al.*, 2003). Il pomodoro può tollerare limitati livelli di carenza idrica (André *et al.*, 1992; Baradas, 1994; Hanson *et al.*, 2004), sebbene sia particolarmente sensibile a fenomeni di stress idrico durante la fioritura.

Il pomodoro si presta particolarmente bene allo studio della risposta allo stress idrico in quanto sono disponibili varietà che richiedono elevati volumi di acqua di irrigazione e molto sensibili allo stress idrico e varietà con differente comportamento tra cui quelle localmente adattate a climi aridi senza disponibilità di sistemi d'irrigazione. Tra queste ultime di grande interesse è il gruppo dei pomodori da serbo, tipicamente coltivati nelle regioni semi-aride del mediterraneo che sono sottoposte a frequenti eventi di siccità (Galmes *et al.*, 2013). Tali ecotipi presentano elevati livelli di tolleranza allo stress idrico attraverso una ridotta perdita d'acqua sia della pianta che dei frutti (Siracusa *et al.*, 2012; Sacco *et al.*, 2015). L'uso di varietà resistenti ridurrebbe dunque l'impatto negativo di stress ambientali sulle produzioni di pomodoro, determinando notevoli vantaggi economici ed ecologici, legati ad un possibile minor fabbisogno idrico. Recentemente anche in pomodoro si sono affermati studi globali

sulla componente trascrittomica, proteica e metabolica. Anche se specifiche criticità ancora esistono sia dal punto di vista tecnico-procedurale che di integrazione delle diverse piattaforme, l'interesse dell'applicazione integrata delle tecnologie -omiche in pomodoro è al momento focalizzata sulla maturazione del frutto. In tale sistema l'analisi dei geni espressi è correlata al corredo proteomico del frutto in maturazione e al profilo dei principali metaboliti e della componente volatile, fattore cruciale dell'aroma globale del frutto (Zhong *et al.*, 2013). Tali approcci hanno già messo in evidenza fondamentali differenze molecolari tra i diversi tipi di pomodoro che caratterizzano le produzioni agricole italiane (tipo Allungato, Vesuviano, Sorrento, Corbarino) che spiegano le loro peculiari e distintive caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Dal punto di vista applicativo le conoscenze acquisite permetteranno lo sviluppo di strumenti di grande efficacia non solo per la selezione di nuovi ecotipi con caratteristiche del frutto migliorate ma anche per la salvaguardia della tipicità dei prodotti locali, la tracciabilità dei prodotti sia freschi che trasformati e la sicurezza alimentare.

1.6 SCOPO E CONTENUTO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si inserisce nelle attività del gruppo della Dott.ssa Stefania Grillo dell'Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR, Sezione di Portici) che da anni è impegnato in studi volti all'identificazione di geni e meccanismi di risposta a stress abiotici sia in organismi modello (Ambrosone *et al.*, 2015) sia in piante di interesse agrario (Iovieno *et al.*, 2016).

Lo studio dei meccanismi fisiologici e molecolari attivati in risposta a condizioni di stress idrico è stato affrontato nel lavoro di tesi utilizzando varietà di pomodoro

tradizionali, tipiche del Sud Italia, adattate a condizioni di coltivazione a ridotto input idrico e note come “da serbo” per le caratteristiche di conservazione dei frutti.

Obiettivo del lavoro di tesi è stato quindi la comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti nella risposta allo stress idrico in questi ecotipi per analizzare i meccanismi genetici alla base della loro elevata tolleranza alla siccità. A tal fine è stato utilizzato un approccio multidisciplinare basato su *a)* uno studio trascrittomico su larga scala, effettuato mediante *RNA-sequencing* che ha consentito di identificare un complesso set di geni la cui espressione è regolata da stress ed è alla base delle risposte fisiologiche e biochimiche osservate; *b)* una dettagliata caratterizzazione biochimica e fisiologica di piante allevate in condizioni di ridotto input idrico in serra e della produzione e qualità dei frutti in campo che ha evidenziato specifici meccanismi di adattamento a stress idrico prolungato presenti negli ecotipi analizzati.

Un ulteriore obiettivo del lavoro di tesi è stato lo studio del ruolo della Glucosio 6 Fosfato Deidrogenasi (G6PDH, EC.1.1.1.49) di pomodoro in risposta a stress idrico. Quest'enzima, catalizza la prima reazione della via ossidativa dei pentosio fosfati, portando alla sintesi di potere riducente sotto forma di NADPH, ed è noto in letteratura per essere un enzima coinvolto nella risposta a stress abiotici di vario tipo (Liu *et al.*, 2013; Cardi *et al.*, 2014). Il comportamento di quest'enzima in risposta a stress salini, ossidativi, nutrizionali sebbene ampiamente descritto, è ancora in parte sconosciuto in relazione alle molteplici risposte della pianta a condizioni di carenza idrica. Inoltre mentre l'enzima è stato ben caratterizzato in numerosi sistemi modello vegetali come arabidopsis, patata, orzo, mais ed altri, non sono riportati studi specifici in pomodoro. In collaborazione con il gruppo di Fisiologia Vegetale del Professore Sergio Esposito dell'Università degli Studi Federico II di Napoli è stato

effettuato uno studio sul ruolo della G6PDH in piante di pomodoro sottoposte a stress idrico. A tal fine è stata eseguita una dettagliata analisi biochimica (attività enzimatica e western blotting) e molecolare (analisi di espressione di geni noti come *stress-responsive* e identificazione dei diversi componenti della famiglia genica delle G6PDH di pomodoro) della G6PDH in foglie di pomodoro prelevate da piante sottoposte a stress idrico, in diversi sistemi sperimentali quali allevamento in campo, allevamento in serra e coltura idroponica.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 ALLEVAMENTO DI PIANTE

2.1.a Serra

Semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) degli ecotipi campani Crovarese, Lucariello, Giallo Beneventano e della cv Red Setter sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 5 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in plateau contenenti terreno e allevate nelle serre della facoltà di Agraria dell'università Federico II di Napoli. Successivamente 17 piante per genotipo sono state trapiantate in vasi da 30 cm di diametro e irrigate per circa 30 giorni. Le piante di ogni genotipo sono state poi suddivise in due gruppi: 8 piante definite controllo e 9 piante definite *drought*. Le piante sono state suddivise in blocchi contenenti individui appartenenti ad ogni genotipo e i blocchi disposti in maniera randomizzata. In particolare, in una prima fase lo stress idrico è stato imposto interrompendo l'irrigazione per 13 giorni, successivamente è stato indotto un periodo di recupero dove le piante sono state irrigate per 15 giorni e infine un secondo ciclo di stress idrico è stato imposto per ulteriori 9 giorni. In collaborazione con i ricercatori dell'istituto CNR-ISAFOM di Ercolano sono stati valutati alcuni parametri fisiologici della risposta alle condizioni di deficit idrico imposte. Inoltre, sono state prelevate foglie dei diversi genotipi, in differenti momenti dell'allevamento e dell'imposizione dello stress idrico, per le successive analisi biochimiche e molecolari. I campioni sono stati quindi congelati in azoto liquido e conservati a -80° C.

2.1.b Campo

Semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) di varie cv ed ecotipi da serbo campani sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 5 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in plateau contenenti terreno e allevate presso l'azienda sperimentale ARCA 2000 (Acerra, Napoli, 40°57'6"12 N; 14°22'37"56 E).

Successivamente 20 piante per genotipo sono state trapiantate in terreno, in campo e irrigate per circa 60 giorni. Successivamente le piante di pomodoro appartenenti ai diversi genotipi sono state suddivise in due gruppi allevati in condizioni di irrigazione continua (piante controllo) e in assenza completa di irrigazione a partire dal secondo mese di crescita (piante *drought*). Foglie dei diversi genotipi sono state prelevate in momenti differenti dall'imposizione dello stress idrico, per le successive analisi biochimiche e molecolari. I campioni sono stati quindi congelati in azoto liquido e conservati a -80° C. Al termine del periodo di allevamento frutti di pomodoro derivanti dai vari genotipi sono stati raccolti per le successive analisi di produzione e qualità dei frutti.

2.1.c Coltura idroponica

Semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) cv Red Setter sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 5 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in vaschette in cui è stata somministrata la soluzione nutritiva descritta in Tab. 2 (G. Colla, Università degli studi della Tuscia, non pubblicato).

Tabella 2: Lista dei componenti utilizzati per la preparazione della soluzione nutritiva utilizzata per la coltura in soluzione idroponica.

| SOLUZIONE NUTRITIVA PER L'IDROCOLTURA | |
|---|------------|
| Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O | 384 mg/L |
| Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O | 812,9 mg/L |
| KNO ₃ | 101,5 mg/L |
| K ₂ SO ₄ | 319,3 mg/L |
| KH ₂ PO ₄ | 204,8 mg/L |
| Hidromix | 14,0 mg/L |

Le piante sono state allevate in camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (26°C/18°C), fotoperiodo (18h luce/6h buio), irradianza (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ed umidità (60%). Dopo circa 3 settimane di allevamento in soluzione idroponica, le piante sono state suddivise in tre gruppi. Ad un primo gruppo di piante è stato aggiunto alla soluzione nutritiva PEG 8000 (Sigma-Aldrich), alla concentrazioni del 15%, per sottoporre le piante a stress idrico; ad un secondo gruppo di piante è stato somministrato NaCl 150 mM per sottoporre le piante a stress salino; il terzo gruppo di piante controllo è stato allevato in soluzione nutritiva semplice per tutta la durata dell'esperimento. Prelievi di foglie sono stati effettuati a 3h,6h,24h,48h dall'insorgenza dello stress, congelati in azoto liquido e conservati a -80° C per le successive analisi.

2.2 PARAMETRI FISIOLGI

2.2.a Conduttanza stomatica e assimilazione fotosintetica

La Conduttanza stomatica fogliare (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-2}$) e l'assimilazione fotosintetica (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sono state rilevate in pieno giorno, mediante analizzatore Licor-6400 (Licor Bioscience, Lincoln, Nebraska USA). Le misurazioni sono state effettuate con con sistema aperto "steady-state" su 3 piante controllo e 3

drought per genotipo, operando su 1 foglia inserita nella porzione apicale dei rametti, e ben esposta alla luce. Gli scambi gassosi sono stati valutati in accordo con il modello di Von Caemmerer e Farquar (1981). Le analisi sono state svolte in collaborazione con i ricercatori del CNR-ISAFOM di Ercolano del gruppo di ricerca dei dottori Giorio e Albrizio.

2.2.b Area fogliare

La superficie fogliare è stata misurata sulla porzione vegetativa prelevata da piante dei vari genotipi sottoposti a stress idrico. Le piante sono state sradicate dal terreno ed è stata allontanata la porzione radicale. Successivamente la superficie dell'area fogliare è stata misurata acquisendo l'immagine con uno scanner (LI – 3400 area meter) ed è stata calcolata la superficie fogliare media per pianta in cm^2/cm^2 . Le analisi sono state svolte presso l'istituto CNR-ISAFOM di Ercolano.

2.3 ANALISI DELLA QUALITÀ DEI FRUTTI

Tutte le analisi della qualità dei frutti (ad eccezione di quelle relative il contenuto di solidi solubili) sono state svolte presso il CNR-ISA di Avellino dal gruppo di ricerca della Dottoressa Filomena Nazzaro.

2.3.a Polifenoli totali

Il contenuto totale in polifenoli è stato determinato per via spettrofotometrica secondo la metodica di Singleton e Rossi (1965), utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu. Frutti di pomodoro prelevati al termine del periodo di allevamento dalle piante in campo sono stati pesati e pestati in etanolo al 50% in un rapporto di 1:2 (p/v) e tenuti al buio overnight. Successivamente i campioni sono stati filtrati e congelati a -26° fino al momento delle analisi. La concentrazione dei polifenoli è stata calcolata

grazie ad una retta di taratura ottenuta con l'acido gallico come standard. Il contenuto di polifenoli nei diversi campioni saggiati è stato espresso come microgrammi equivalenti di acido gallico/g di campione iniziale. Ogni campione è stato saggiato in duplicato e il saggio è stato condotto almeno due volte separatamente.

2.3.b Attività antiossidante

L'attività antiossidante sui radicali liberi è stata misurata mediante il radicale stabile 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Frutti di pomodoro prelevati al termine del periodo di allevamento dalle piante in campo sono stati pesati e pestati in etanolo al 50% in un rapporto di 1:2 (p/v) e tenuti al buio overnight. Successivamente i campioni sono stati filtrati e congelati a -26° fino al momento delle analisi. L'assorbanza è stata misurata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 517nm. L'attività antiossidante è espressa come EC₅₀, ed è definita come il quantitativo di campione necessario (riferito in mg) necessario ad inibire l'attività di 1mL DPPH del 50% dopo un'incubazione di 60 minuti. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato e il saggio è stato condotto almeno due volte separatamente.

2.3.c Licopene

Frutti di pomodoro prelevati al termine del periodo di allevamento dalle piante in campo sono stati pesati e pestati in etanolo al 50% in un rapporto di 1:2 (p/v) e tenuti al buio *overnight*. Successivamente i campioni sono stati filtrati e congelati a -26° fino al momento delle analisi. L'estrazione del licopene è stata effettuata utilizzando un soluzione contenente esano, metanolo e acetone in rapporto 2:1:1, e il 2.5% BHT in un rapporto di 1:5 (p/v). Il surnatante ottenuto è stato letto allo spettrofotometro a

502nm e a 450nm. La retta di taratura è stata realizzata a varie concentrazioni di licopene.

2.3.d Beta Carotene

Frutti di pomodoro prelevati al termine del periodo di allevamento dalle piante in campo sono stati pesati e pestati in etanolo al 50% in un rapporto di 1:2 (p/v) e tenuti al buio overnight. Successivamente i campioni sono stati filtrati e congelati a -26°. Per l'estrazione dei carotenoidi, 2 grammi di campione sono stati pestati in 2ml di etanolo e aggiunti 3 ml di etere di petrolio. Successivamente il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 1000 rpm. Dalla fase superiore sono stati prelevati 2 ml che sono stati letti allo spettrofotometro a 450nm. Come standard è stato usato il beta carotene a varie concentrazioni.

2.3.e Contenuto in solidi solubili (gradi brix)

Frutti di pomodoro prelevati da ogni singolo genotipo al termine del periodo di allevamento sono stati prelevati, lavati con acqua e pesati. I pomodori sono stati successivamente frullati assieme e il succo è stato analizzato in triplicato tecnico. La percentuale di gradi brix è stata infine misurata utilizzando 500-1000 µl di succo di pomodoro utilizzando lo strumento Pocket refractometer PAL 1 (Atago).

2.4 PARAMETRI BIOCHIMICI

2.4.a Determinazione del contenuto in Prolina

Foglie di pomodoro prelevate da piante allevate in condizione di stress idrico sono state utilizzate per analizzare il contenuto di prolina libera. L'estrazione è stata condotta secondo il metodo descritto da Clausen (2005). 250 mg di tessuto vegetale sono stati macinati in azoto liquido. Il macinato è stato risospeso in una soluzione acquosa di acido 5-sulfosalicilico di-idrato (3%, w/v). La sospensione è stata chiarificata mediante filtri Ederol rundfilter (Schleicher & Schull). Un millilitro di filtrato è stato diluito in 1 ml di acido acetico glaciale ed 1 ml di soluzione di 2,5% (w/v) ninidrina (acido acetico glaciale, acqua distillata e 85% acido ortofosforico in rapporto 6:3:1). Tre millilitri della soluzione ottenuta sono stati incubati a 100°C per un'ora. Un millilitro di soluzione è stato letto allo spettrofotometro (Beckman DU-640 spectrophotometer) alla lunghezza d'onda di 546 nm. Le analisi sono state effettuate in duplicato, considerando almeno tre repliche biologiche.

2.4.b Determinazione del contenuto di Acido Abscissico

Foglie di piante di pomodoro prelevate in diverse fasi sperimentali dell'imposizione dello stress idrico sia in vaso che in coltura idroponica, sono state saggiate per il contenuto in acido abscissico (ABA). L'acido abscissico è stato quantificato mediante saggio indiretto ELISA usando il kit Phytodetek ABA test (Agdia Incorporated, In, USA). Circa 250 mg di tessuto fogliare sono stati macerati in azoto liquido, i campioni ottenuti sono stati sospesi in 2 mL di H₂O sterile e lasciati in agitazione per 16 ore al buio a 4°C. I campioni sono stati centrifugati a 10000 rpm (Centrifuga 5424 R, eppendorf) per 10 min e i corrispettivi surnatanti sono stati

recuperati e diluiti di 50 volte in un opportuno buffer salino (25 mM trizma Base, 100 mM NaCl e 1 mM MgCl₂-6H₂O). Il saggio ELISA è stato condotto seguendo il protocollo indicato dal fornitore. La quantificazione dell'ABA è stata effettuata su tre repliche biologiche.

2.5 ANALISI MOLECOLARI

2.5.a Estrazione di RNA totale e sintesi di cDNA

L'RNA totale è stato isolato da tessuti di pomodoro conservati a -80°C usando 100 mg di tessuto macerato, cui è stato aggiunto un 1 ml di Trizol (Life technologies, Carlsbad, California, USA). I campioni sono stati incubati per 5 min a temperatura ambiente e sono stati centrifugati per 15 min a 12000 g a 4°C (Centrifuga 5424 R, eppendorf). Al surnatante sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio ed è stata effettuata un'incubazione per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente la soluzione è centrifugata a 12000 g per 15 min a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata ed è stata effettuata la precipitazione dell'RNA aggiungendo 500 µl di isopropanolo per 10 min a temperatura ambiente. Dopo la successiva centrifugazione a 12000 rpm (15 min, 4 °C) i pellet sono stati lavati mediante due lavaggi con etanolo alle concentrazioni del 97% e 70% intervallati da centrifugazione a 7500 rpm (5 min, 4 °C). Infine i campioni sono stati risospesi in 30 µl di H₂O sterile RNasi Free. La concentrazione e la purezza (assenza di contaminanti) dei campioni di RNA estratti è stata determinata mediante lettura al NanoDrop 1000 Spectrophotometer v 3,60. Alternativamente l'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit d'estrazione Quantitech® reverse transcription Kit (Quiagen, Hilden Germany). 100 mg di tessuto di pomodoro conservati a -80°C sono stati macinati ed estratti secondo il protocollo indicato dal fornitore. L'RNA ottenuto è stato saggiato mediante elettroforesi capillare tramite bioanalyzer (Agilent

2100, Bioanalyzer) e utilizzato per il sequenziamento RNA-seq. Per le analisi di qRT-PCR, la sintesi di cDNA è stata effettuata, a partire da 1 µg di RNA totale, utilizzando il Quantitech reverse transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany), che ha previsto un preliminare trattamento con DNAsi seguito da una reazione di sintesi del cDNA effettuati seguendo il protocollo indicato dal fornitore.

2.5.b Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA

I campioni di RNA sono stati esaminati mediante elettroforesi per verificare l'integrità e l'assenza di contaminazione di DNA genomico residuo (Tab. 3).

Tabella 3: Composizione dei tamponi e del gel utilizzato per la corsa elettroforetica per la verifica dell'integrità dei campioni di RNA estratti da foglie di pomodoro.

| Tampone MOPS 10X | Tampone Denaturante | Gel di Agarosio |
|--|---------------------------------|--------------------------|
| Acido N-morfolino propansulfonilico pH 7 0,2 M | Formammide 750 µl | Agarosio (1,2%) 0,75 g |
| Sodio acetato 80 mM | 10X MOPS 120 µl | 1X MOPS 6 ml |
| EDTA 10 mM | 37% formaldeide 250 µl | Formaldeide 3,5 ml |
| - | 10 µg/µl bromuro di etidio 1 µl | H ₂ O 50,5 ml |

I campioni eluiti nel tampone denaturante sono stati incubati per 5 min a 65°C e successivamente sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% in condizioni denaturanti per la presenza di formaldeide al 6%, La corsa è stata condotta a 50 V costanti (alimentatore Powerpac Basic, Biorad) utilizzando come tampone il MOPS 1X, in una camera elettroforetica (Bio-Rad, Hercules, California, USA) previamente trattata con H₂O₂ ed etanolo assoluto, per allontanare eventuali RNasi contaminanti. L'integrità dell'RNA è stata controllata al Chemidoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

2.5.c Real-time PCR (qRT-PCR)

Lo studio dell'espressione di alcuni geni di interesse è stata effettuata mediante Real Time PCR (qRT-PCR). Il cDNA ottenuto come indicato nel paragrafo 2.5.a, è stato amplificato mediante l'utilizzo della Platinum® SybrGreen® PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad,

California, USA), utilizzando il sistema di rilevazione e di analisi 7900 HT FAST REAL-TIME PCR SYSTEM (Applied biosystem, Foster city, California, USA). La reazione di PCR è stata allestita utilizzando 4,25 µl di cDNA, diluito 10-20 volte, come template ed aggiungendo 6,5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1,25 µl di Primer mix (4,28 mM oligo forward e 4,28 mM oligo reverse) e 0,5 µl di H₂O bidistillata fino ad un volume finale di 12,5 µl. L'amplificazione è stata condotta secondo i seguenti parametri per 40 cicli totali: denaturazione 95°C per 15 sec; annealing ed estensione 60°C per 1 min. Ogni amplificazione è stata ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza sono stati poi analizzati dal software RQ Manager 1,2 (Applied Biosystems, Foster city, California, USA) per calcolare i livelli d'espressione relativa (valori dell'RQ - *Relative Quantification*) con il metodo del 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak e Schmittgen, 2001). I valori dell'RQ sono stati ottenuti utilizzando il gene Elongation Factor 1 α che è stato testato come controllo endogeno della reazione (Nicot *et al.*, 2005). La lista di tutti primers utilizzati è riportata nella Tab. 4.

Tabella 4: Lista dei primers utilizzati per le analisi di qRT-PCR.

| Locus | Name | Sequence |
|----------------|----------------------------|-----------------------|
| Solyc03g007230 | SL-PP2C Fw | GATGCGGTGGCGATTTATCC |
| | SL-PP2C Rv | CCTCCATGCCCGTCGTAAA |
| Solyc04g078840 | SL-Bzip Tf Fw | TGGTATCCCTGATCCAGCAC |
| | SL-Bzip Tf Rv | CCACTGGCTCCTAAACCTACC |
| Solyc03g117800 | SL-CER1 Fw | TGCACTCTACCTTGCTCGTC |
| | SL-CER1 Rv | CTGGCACTCAACAGTAGCTT |
| Solyc03g116100 | SL-Myb Fw | CAATTGGGTCAGGGTCGAGT |
| | SL-Myb-Rv | TCAGGTGTGAAAGCATTGCC |
| Solyc01g079180 | SL-Pectinesterase Fw | CCGTAGCAAAGAAAGTGGCG |
| | SL-Pectinesterase Rv | CCTGTCCCTGTTATGGTGCT |
| Solyc03g013340 | SL-Acquporin Z Fw | GGGAATTGCAGTTGGTTCCGG |
| | SL-Acquporin Z Rv | GCTGGTCCAATGCTTCTAGC |
| Solyc05g014000 | SL-Pectato lyase Fw | TTGTTGGCGATGTGATCCTA |
| | SL-Pectato lyase Rv | CCTGGCTTTGGATTTACTGG |
| Solyc05g041200 | SL-Fitoene desaturase Fw | ATTTGAGAAGTAGGGCCGGG |
| | SL-Fitoene desaturase Rv | TCCCCTGATCATCCCTGTCA |
| Solyc09g007270 | SL-Ascorbato peroxidase Fw | TTGAGGGAGCATGGACCAAC |
| | SL-Ascorbato peroxidase Rv | ATGGTAGCTGGAGGAGACCT |
| Solyc09g075460 | SL-Polygalacturonase Fw | CAGGGAATTTACCCGGGCTA |
| | SL-Polygalacturonase Rv | CCATGGTGTAGAAGGGTCGG |
| Solyc02g085150 | SL-LEA4 Fw | ACAACAGTGCCAAGAACACG |
| | SL-LEA4 Rv | TTTGCTCCAACGTTACCTGC |
| Solyc03g007310 | SL-ABA receptor Fw | CTGTGCACCCAGAGGTGATT |
| | SL-ABA receptor Rv | CGTCTTTGGTGTTCCCTTCG |
| Solyc07g063600 | SL-Chlorophyll binding Fw | GAGCATTCTAGCAGTATTGGG |
| | SL-Chlorophyll binding Rv | TGTTGCCTTCACCAACTCCA |
| Solyc07g056570 | NCED Fw | CATAATCGAAAACCCGGATG |
| | NCED Rv | AACTTTTGGCCATGGTTCAG |
| Solyc08g043170 | P5CS Fw | AACTGAGCTTGATGGCAAGG |
| | P5CS Rv | ACCAGAGGCTGAGCTGATGT |
| Solyc02g093830 | G6PDH Fw | CAACCTCTATCGGCAGGGAT |
| | G6PDH Rv | CCCAGAAAGATACCCACGA |
| Solyc06g005060 | Elongation Factor Fw | GGTCACCTTGGCACCAGTTG |
| | Elongation Factor Rv | CTCCATTGGGTGTTTTGCT |
| Solyc03g112590 | SL-Photosystem repair Fw | AAGGACGTGGATCTGTCAGC |
| | SL-Photosystem repair Rv | TGGCATATTTGCATGCTCGC |

2.5.d Sequenziamento NGS

Campioni in triplicato di foglie prelevate nella fase sperimentale di allevamento in serra S1 (Fig. 8) da piante controllo e *drought* dai genotipi Crovarese e Lucariello sono stati utilizzati per il sequenziamento mediante tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*). L'RNA estratto tramite il reverse transcription Kit (Quiagen, Hilden Germany) è stato trattato con DNAasi e purificato utilizzando l'RNeasy Plant Mini kit (Quiagen, Hilden Germany) seguendo il protocollo fornito dal produttore. I campioni di RNA purificati sono stati successivamente analizzati quantitativamente e qualitativamente utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDropTechnologies) e attraverso elettroforesi capillare su chip tramite l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le librerie di cDNA sono state preparate utilizzando un 1ug di RNA totale utilizzando l'Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Le dimensioni e l'integrità delle librerie sono state verificate utilizzando nuovamente l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA). Successivamente le librerie sono state diluite alla concentrazione di 2 nM e denaturate. Infine sono stati preparati i cluster per il sequenziamento caricando 8 pM all'interno del cBot (Illumina, San Diego CA) utilizzando il cBot single End Cluster Generation Kit (Illumina, San Diego, CA). Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando la tecnologia Illumina HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA). Il servizio di preparazione delle librerie e di sequenziamento è stato effettuato in service dalla Genomix4life Ltd (<http://www.genomix4life.com>) presso il laboratorio di Medicina molecolare e genomica dell'università di Salerno.

2.6 ANALISI BIOINFORMATICHE

Le analisi Bioinformatiche sono state eseguite presso i laboratori della Sequentia Biotech SL (Campus UAB - Barcellona, Spain).

2.6.a Trimming delle sequenze grezze

Le sequenze grezze ottenute tramite tecnologia NGS sono state lavorate al fine di migliorarne la qualità ed allontanare le sequenze relative gli adattatori Illumina utilizzate per il processo di sequenziamento. A tale scopo è stato utilizzato il software TRIMMOMATIC (Bolger *et al.*, 2014). I parametri settati per l'analisi sono stati ILLUMINACLIP (2:30:10), LEADING (25), TRAILING (25), CROP (101), HEADCROP (10), SLIDINGWINDOW (3:0), MINLEN (35). Prima e dopo il processo di Trimming le sequenze sono state analizzate con il software FAST QC per controllarne la qualità.

2.6.b Mapping & Reads Count

Le sequenze modificate attraverso il software Trimmomatic sono state utilizzate per il mappaggio sul genoma di Pomodoro. A tal fine sono stati utilizzati come riferimento sia il genoma di pomodoro varietà Heinz (*The tomato genome consortium*, 2012), che i genomi dei due ecotipi (dato non pubblicato). Il processo di mappaggio è stato effettuato utilizzando il software STAR (Dobin *et al.*, 2013), utilizzando i seguenti parametri: *alignIntronMax* (0), *alignIntronMin* (20), *outSAMstrandField* (None), *outSAMtype* BAM (SortedByCoordinate), *outFilterScoreMin* (0), *outBAMcompression* (10), *outReadsUnmapped* (Fastx), *outFilterMismatchNmax* (7), *alignEndsType* (EndToEnd), *seedSearchStartLmax* (50), *outFilterScoreMinOverLread* (0), *outFilterMatchNminOverLread* (0), *outSJfilterCountUniqueMin* (3 3 3 3), *outSJfilterCountTotalMin* (3 3 3 3), *outFilterType*

(*BySJout*), *runThreadN* (1), *outSJfilterIntronMaxVsReadN* (50000 10000 20000), *alignSJDBoverhangMin* (3), *alignSJlooverhangMin* (5), *alignMateGapMax* (1000). Siccome per entrambi i processi di *mapping* le sequenze mappate univocamente sul genoma sono risultate essere in tutte le repliche biologiche superiori al 90%, sono state le uniche tenute in considerazione per il processo di conteggio. A tal fine è stato utilizzato il software FEATURECOUNTS (Liao *et al.*, 2014). Alla termine del processo di mappaggio, la qualità di quest'ultimo è stata valutata attraverso il software SAMTOOLS.

2.6.c Analisi statistica e dei geni diff. espressi

L'analisi statistica e dei geni differenzialmente espressi è stata effettuata attraverso R. Questo è un linguaggio ed un ambiente software open source specifico per l'analisi statistica dei dati e per la produzione di grafici. I conteggi grezzi ottenuti attraverso il software FEATURECOUNTS sono stati normalizzati attraverso il metodo TMM (Trimmed mean). A tale scopo è stato utilizzato il pacchetto di R, **HTSfilter** (Rau *et al.*, 2013), dedicato alla normalizzazione dei dati grezzi e al filtraggio dei dati. E' stato quindi possibile calcolare il valore di threshold necessario affinché i geni siano considerati effettivamente diversamente espressi in maniera significativa. Infine è stato utilizzato un secondo pacchetto di R, **Edge R** (Robinson *et al.*, 2010) che esegue l'analisi dei geni differenzialmente espressi, mettendo assieme le varie repliche biologiche e imposta il confronto tra campioni controllo e campioni *drought*. Inoltre attraverso questo pacchetto è stato possibile calcolare la significatività dei risultati. In particolare dopo aver calcolato il valore di p.value per tutti i geni reputati differenzialmente espressi questo valore è stato ulteriormente corretto attraverso la

metodica del FDR (*False Discovery Rate*). Solo i geni che hanno presentato un valore di FDR inferiore/uguale a 0,05 sono stati ritenuti realmente differenzialmente espressi.

2.6.d Gene Ontology enrichment analysis

L'analisi di arricchimento delle categorie gene Ontology (GO) è stata effettuata utilizzando il software disponibile online sul sito **AGRIGO** (Zhou *et al.*, 2010). Le liste di geni upregolati e downregolati sono state caricate separatamente nella suite del sito, impostando come file di annotazione l'ITAG 2.4. I parametri settati sono stati: *Statistical Test Method* (Hypergeometric); *Multitest Adjustment* (Hochberg, FDR); *Significant level* (0,05). Al fine di migliorare l'analisi di arricchimento GO le liste di geni differenzialmente espressi ottenute, sono state filtrate per fold change $>/<$ di $+2/-2$. Solo le categorie GO che presentavano almeno 5 geni sono state mantenute al fine del risultato finale.

2.6.e Costruzione di Alberi filogenetici

La costruzione degli alberi filogenetici è stata effettuata utilizzando il software MEGA versione 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Le sequenze amminoacidi selezionate per l'elaborazione degli alberi filogenetici sono state individuate mediante ricerca in banche dati online sui siti <https://solgenomics.net>, <https://www.arabidopsis.org> e <http://plants.ensembl.org>. Successivamente utilizzando il software MEGA è stato effettuato l'allineamento delle sequenze proteiche mediante l'utilizzo dell'algoritmo MUSCLE, utilizzando i parametri di default. È stato poi identificato il modello di sostituzione specifico per ogni allineamento ed è stato costruito l'albero filogenetico attraverso il metodo della massima verosimiglianza. Ogni test di filogenia è stato effettuato utilizzando un valore di bootstrap uguale a 100.

Tabella 5: Lista dei software utilizzati per le analisi bioinformatiche.

| Software | Funzione | Sito internet |
|-----------------|-------------------------------------|--|
| FAST QC | Analisi della qualità delle reads | www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc |
| Trimmomatic | Trimming delle raw-reads | www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic |
| STAR | Mapping | code.google.com/p/rna-star |
| Featurescount | Conteggio delle reads mappate | bioinf.wehi.edu.au/featureCounts/ |
| SAMTOOLS | Analisi della qualità del mappaggio | samtools.sourceforge.net/ |
| Edge R | Analisi dei geni diff espressi | bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR |
| MEGA | Costruzione alberi filogenetici | en.bio-soft.net/tree/MEGA.html |
| AgriGO | Analisi di arricchimento GO | bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/ |

2.7 SAGGI ENZIMATICI E WESTERN BLOTTING

2.7.a Preparazione dell'estratto grezzo

Per l'estrazione proteica, foglie di piante di pomodoro sono state prelevate, separate e pesate. I campioni sono stati polverizzati a mano in un mortaio con aggiunta di azoto liquido, successivamente è stato aggiunto il tampone di estrazione in rapporto peso/volume 1:2, composto da 50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 4 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 10% glicerolo, 15 µM NADP⁺, 1 ml/30 gr Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P9599). Successivamente i campioni sono stati omogeneizzati mediante l'utilizzo del TissueLyser con due sfere di acciaio per ciascun campione (Stainless Steel Beads; ø 5 mm). L'estratto così ottenuto è stato centrifugato per 20'a 12500 rpm a 4°C (centrifuga Beckman J2-21 rotore Beckman JA-25). Il surnatante è stato prelevato e nuovamente centrifugato per 10'a 12500 rpm a 4°C. Il surnatante prelevato è stato definito estratto grezzo e utilizzato per i saggi enzimatici.

2.7.b Determinazione delle proteine

La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il saggio del Blue-Coomassie R-250 (Bradford, 1976) utilizzando una retta di taratura ottenuta a

concentrazioni note di BSA (albumina di siero bovina). Aliquote di estratto (2-4 μ l) sono state saggiate mediante il reattivo Bradford Protein Assay (Bio-Rad) secondo le istruzioni fornite dal fabbricante e l'assorbanza a 595 nm registrata allo spettrofotometro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis).

2.7.c Determinazione della attività G6PDH

L'attività totale della G6PDH in foglie di pomodoro è stata valutata misurando la riduzione del NADP⁺ a 340 nm; la miscela di reazione presentava la seguente composizione: Tris HCl 25 mM pH 8; MgCl₂ 5 mM; NADP⁺ 150 μ M; G6P 3 mM; estratto (10-100 μ l). Tutte le misurazioni sono state effettuate in cuvette da 1 cm di cammino ottico, e la variazione di assorbanza è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis). Tutte le misure sono state effettuate in triplicato. L'attività totale della G6PDH è espressa come nm di NADP⁺ ridotto per min⁻¹ mg⁻¹ prot.

2.7.d Estrazione HSP70

Campioni di foglie di pomodori sono stati polverizzati in azoto liquido con l'ausilio di mortaio e pestello; 300 mg di campione polverizzato sono stati successivamente omogenizzati con il tampone di estrazione (32 mM Tris HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 1 mM β -mercaptoetanolo; 0.5% di Triton X-100; 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)) in un rapporto di 1:2 tra peso fresco del campione e volume di tampone d'estrazione mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore automatico TissueLyser con due sfere di acciaio per ciascun campione (Stainless Steel Beads; \varnothing 5 mm). Successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 4°C per 20 min a 13000 rpm in una centrifuga Thermo Scientific SL16R; dopo la centrifugazione il surnatante

contenente le proteine solubili è stato nuovamente centrifugato per 10 min. La concentrazione proteica è stata misurata come descritto nel paragrafo 2.7.b.

2.7.e Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting

Gli estratti proteici utilizzati per i saggi di attività della G6PDH e delle HSP70 sono stati caricati su un gel SDS-page (running gel al 10% e stacking gel al 4% di poliacrilammide) e sottoposti a corsa elettroforetica (180 V e 40 mA). I campioni sono stati preventivamente denaturati per 10 min a 100°C in 0.125 M Tris- HCl; 4% SDS; glicerolo 20%; 0.2 M DTT; 0.02% blu di bromofenolo pH 6.8. I polipeptidi separati attraverso l'elettroforesi SDS-PAGE sono stati sottoposti ad una analisi Western Blotting. Le proteine presenti sul gel sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond (Scheichler - Schuell Protran BA 83 0.2 µM), ponendo entrambi in un'apposita cella (BIO-RAD Mini-Protean Tetra System), ricoperta di tampone di trasferimento e sottoposta ad un campo elettrico di 9V/25V, 300 mA a 4°C overnight. Il corretto trasferimento delle proteine è stato verificato colorando la membrana di nitrocellulosa con rosso Ponceau per 20'. Dopo aver allontanato il colorante attraverso tre lavaggi da 10 min in TBS (tampone Tris salino: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl), la membrana è stata incubata per 2 h con anticorpo primario per cyt-G6PDH (Wendt *et al.*, 2000; Castiglia *et al.*, 2015) o anticorpo primario anti-HSP70 (Esposito *et al.*, 2012). I peptidi di interesse sono stati identificati mediante incubazione con anticorpo secondario anti-rabbit IgG (peroxidase conjugate-Sigma) diluito 1:16000 in TBS. La rivelazione delle proteine è stata effettuata mediante kit ECL (Western Bright™ Quantum, ADVANSTA) utilizzando il sistema ChemiDoc (BIO-RAD XRS).

CAPITOLO 3: RISULTATI

3.1 STUDIO DEI MECCANISMI FISIOLÓGICI E MOLECOLARI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN POMODORO

Lo studio dei meccanismi fisiologici e molecolari attivati in risposta a condizioni di stress idrico è stato affrontato utilizzando alcune varietà di pomodoro tradizionali, tipiche del sud Italia, adattate a condizioni di coltivazione a ridotto input idrico e note come “da serbo” per le caratteristiche di conservazione dei frutti.

A tal fine, è stata inizialmente effettuata una valutazione della risposta a stress da privazione d’acqua in campo, di diverse accessioni di pomodoro allo scopo di selezionare genotipi in grado di garantire la produttività e la qualità nutrizionale dei frutti anche in presenza di stress idrico. I genotipi d’interesse selezionati sono stati poi utilizzati per uno studio in condizioni ambientali controllate, in serra, al fine di effettuare una dettagliata caratterizzazione biochimica, fisiologica e molecolare. In tale ambito è stata infine effettuata su due varietà tipiche un’analisi globale del trascrittoma in condizioni di stress mediante *RNA-sequencing* per identificare i geni coinvolti nella risposta a stress e le funzioni biologiche caratteristiche dei genotipi da serbo e putativamente coinvolte nei meccanismi di tolleranza.

3.1.1 CARATTERIZZAZIONE BIO-AGRONOMICA DI GENOTIPI DI POMODORO ALLEVATI IN CAMPO

Una collezione di ecotipi locali di pomodoro da serbo, adattati alla crescita in condizioni di siccità (Tab. 6) è stata utilizzata per l’allevamento nel periodo maggio – settembre in campo, in condizioni di ridotto input idrico presso l’azienda sperimentale

ARCA 2000 (Acerra, Napoli). Piantine di pomodoro cresciute per circa tre settimane sono state trapiantate in campo, in terreno e allevate in regime irriguo standard per 60 giorni. Successivamente le piante di ciascun genotipo sono state suddivise in due gruppi allevati in condizioni di irrigazione continua (piante controllo) e in assenza completa di irrigazione (piante *drought*). L'esperimento è stato ripetuto tre volte negli anni 2012, 2013 e 2014.

Tabella 6: Lista dei genotipi di pomodori utilizzati per gli esperimenti di allevamento in campo

| Codice | Ecotipi/Varietà | Accrescimento | Stress Idrico |
|--------|----------------------|---------------|---------------|
| SR7 | Tondo Piccolo | Indeterminato | Tollerante |
| SR12 | Giallo Beneventano | Indeterminato | Tollerante |
| SR13 | Giallo CasteldiSasso | Indeterminato | Tollerante |
| SR15 | Seccagno | Indeterminato | Tollerante |
| SR22 | 22/030 | Indeterminato | Tollerante |
| SR30 | Cv M82 | Determinato | Suscettibile |
| SR31 | Crovarese | Indeterminato | Tollerante |
| SR34 | Lucariello | Indeterminato | Tollerante |
| SR37 | Locale Salina | Indeterminato | Tollerante |
| SR43 | Red Setter | Determinato | Suscettibile |

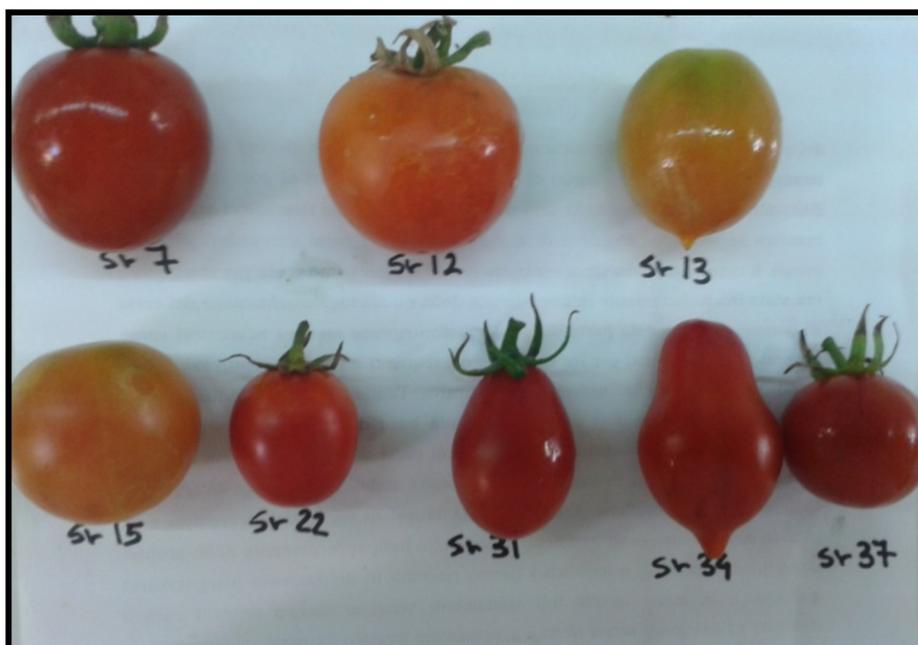


Figura 1: Morfologia e caratteristiche dei frutti di alcuni genotipi di pomodoro utilizzati per l'allevamento in campo.

3.1.1.a Analisi della produzione

Al termine del periodo di allevamento 10 piante per ogni genotipo (5 piante controllo e 5 piante *drought*) sono state selezionate per rilevare i dati di produzione dei frutti (produzione totale, produzione commerciabile). L'analisi statistica (Fig. 2) ha chiaramente indicato che alcuni genotipi da serbo tipici della Campania come Giallo Beneventano, Crovarese e Lucariello hanno subito in condizione di stress una riduzione contenuta della produzione per pianta, con valori medi pari al 3%, il 10% e l'8% rispettivamente. La varietà da industria M82 ha mostrato nelle piante allevate in assenza di irrigazione una riduzione del 30% di produzione mentre la varietà da industria Red Setter ha avuto una perdita di produzione intermedia pari al 13%. Inoltre nei genotipi da serbo, rispetto a quelli da industria, anche la riduzione di peso dei frutti in seguito a stress è risultata più contenuta. Infatti mentre i pomodori da serbo non sembrano risentire delle condizioni di siccità non modificando sostanzialmente il proprio peso, i pomodori delle varietà da industria raccolti da piante cresciute in assenza di irrigazione mostrano una riduzione media del peso di circa il 70% (dato non mostrato).

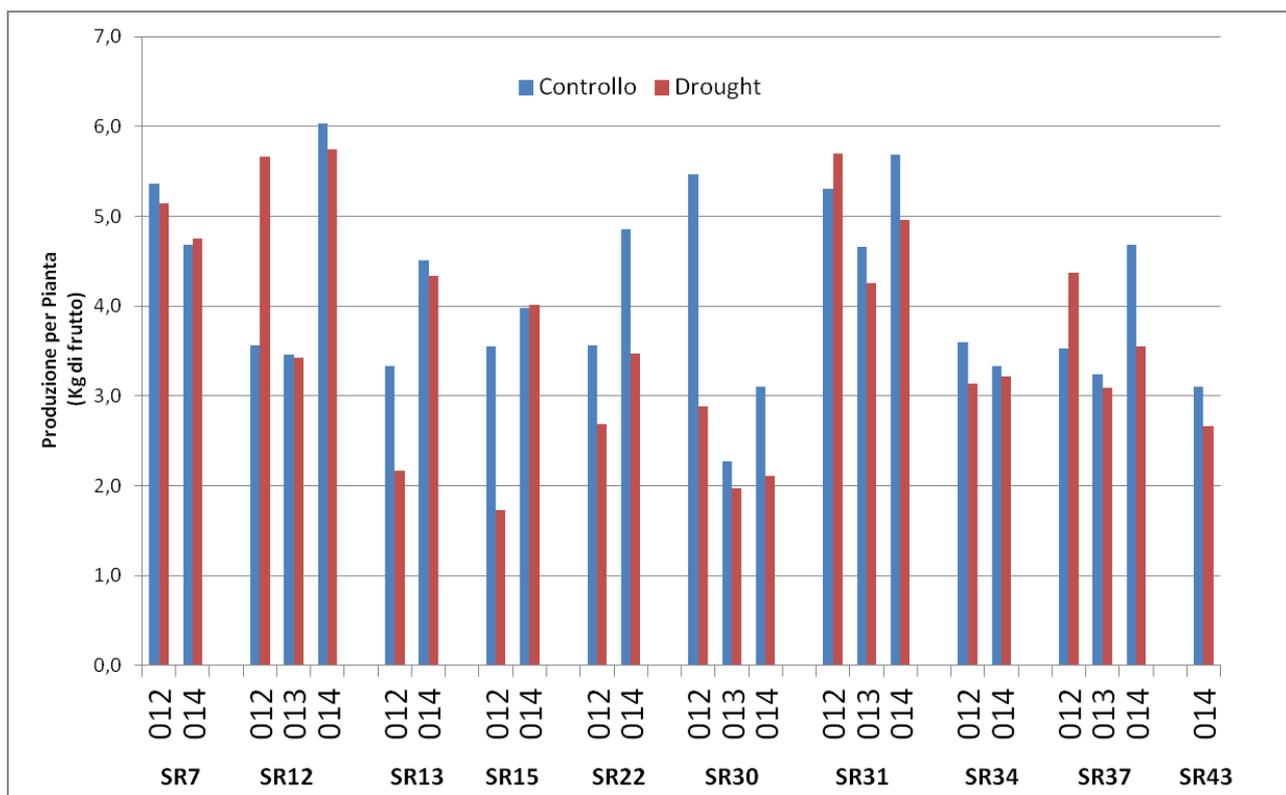


Figura 2: Analisi della produzione nei genotipi allevati in campo, in condizioni controllo (blu) e Drought (rosso), negli anni 012 (2012), 013 (2013), 014 (2014).

3.1.1.b Parametri qualitativi dei frutti

I frutti di alcuni genotipi di pomodoro ritenuti più interessanti (Giallo Beneventano, Crovarese, Lucariello, Locale Salina e Red Setter) provenienti da piante controllo e *drought* sono stati selezionati per studiare l'effetto dello stress su alcuni parametri qualitativi. In particolare in collaborazione con il CNR-ISA di Avellino sono stati determinati i livelli di licopene, antiossidanti, polifenoli e carotenoidi e il contenuto di solidi solubili.

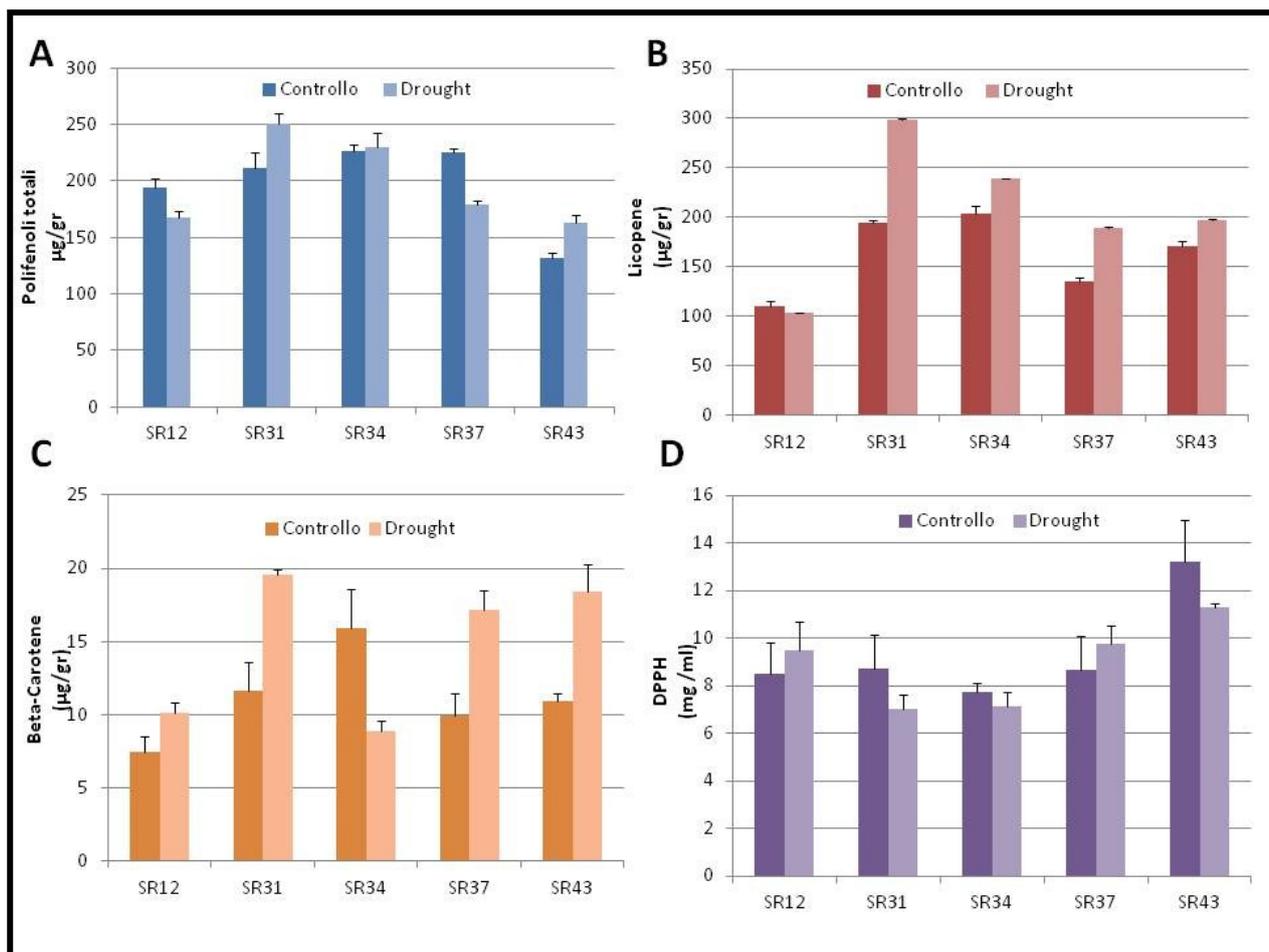


Figura 3: Analisi qualitative dei frutti di genotipi allevati in campo, in condizioni controllo (barre scure) e Drought (barre chiare); A) Contenuto di Polifenoli totali; B) Contenuto di Licopene; C) Contenuto di beta-carotene; D) Potere antiossidante.

Polifenoli totali

Il contenuto totale in polifenoli è stato determinato per via spettrofotometrica secondo la metodica di Singleton e Rossi (1965). I risultati (Fig. 3A) mostrano che i livelli di polifenoli nei frutti dei genotipi in esame variano tra i 130 e i 250 µg/gr di frutto. Nel genotipo giallo (SR12) e nel genotipo Locale Salina (SR37), i livelli di polifenoli si riducono nei frutti di piante *drought* rispetto quelli delle piante controllo. Nei restanti genotipi dai frutti rossi, il contenuto di polifenoli totali aumenta in seguito a stress idrico. La condizione di stress non sembra influenzare il contenuto in polifenoli nei frutti del genotipo Lucariello.

Licopene

Il contenuto in Licopene è stato determinato per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 502 nm. Come mostrato in Fig. 3B, tutti i genotipi che producono pomodori rossi, presentano un aumento dei livelli di licopene nei campioni non irrigati rispetto quelli irrigati. In particolare i 3 genotipi da serbo rossi, SR31, SR34 e SR37 presentano un consistente aumento dei livelli di licopene, rispettivamente del 34%, 14% e 28%. Al contrario il genotipo giallo presenta un contenuto essenzialmente simile di licopene nei frutti da piante controllo e *drought*.

Carotenoidi

Il contenuto di beta carotene totale è stato determinato per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 450 nm. I risultati della determinazione (Fig. 3C) indicano che i frutti delle piante *drought* accumulano maggiori livelli di beta carotene rispetto ai frutti di piante controllo; i genotipi SR31, SR37 e SR43 mostrano un aumento medio dei livelli di beta carotene di circa il 40%. Mentre nel genotipo SR12 l'aumento è di circa il 24%. Nei frutti del genotipo SR34 si è evidenziato una riduzione della concentrazione di beta carotene in seguito a stress idrico.

Attività antiossidante

L'attività antiossidante sui radicali liberi è stata misurata mediante inibizione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Come mostrato in Fig. 3D, l'analisi dell'attività antiossidante mostra risultati simili a quelli riscontrati nel dosaggio dei polifenoli con un aumento in risposta a stress nei genotipi SR12 e SR37 e una riduzione nei genotipi SR31 e SR43. Similmente al contenuto in polifenoli, il contenuto in antiossidanti non risultata influenzato dalle condizioni di stress nel genotipo Lucariello.

Contenuto in solidi solubili (gradi brix)

Al termine dell'esperimento condotto nel 2014 è stato determinato il valore dei gradi brix, un importante parametro qualitativo per i pomodori da industria, che indica il valore delle sostanze allo stato solido dissolte in un liquido. Un grado Brix (simbolo °Bx) corrisponde a 1 parte di sostanza solida (peso secco) in 99 parti di soluzione.

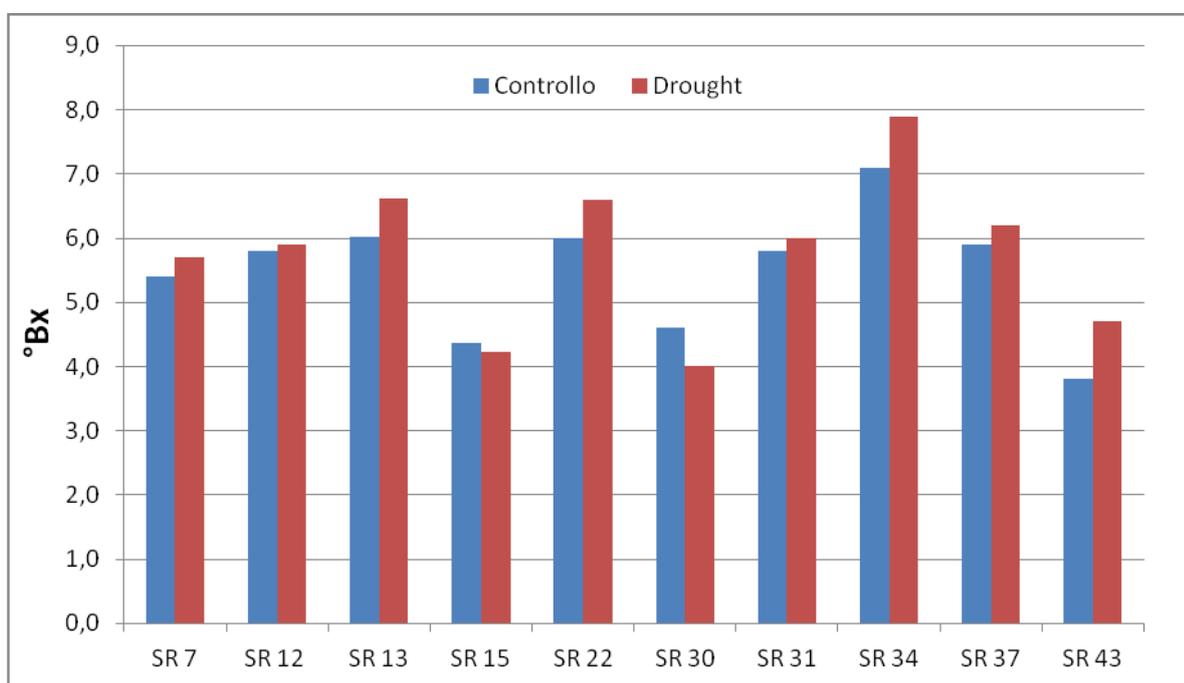


Figura 4: Contenuto in solidi solubili (gradi Brix) nei frutti di pomodori nei genotipi indicati raccolti da piante allevate in campo in condizioni controllo (blu) e *Drought* (rosso).

Come mostrato in Fig. 4, nella varietà da industria M82 (SR30) il valore dei gradi brix diminuisce in seguito a stress idrico, da 4,6 a 4°Bx. I frutti di tutti i genotipi da serbo hanno mostrato valori di gradi brix aumentati nelle piante *drought* rispetto al controllo.

3.1.1.c Contenuto in prolina

La caratterizzazione è proseguita con la valutazione del contenuto in prolina, il cui accumulo in seguito a stress è noto in varie specie vegetali.

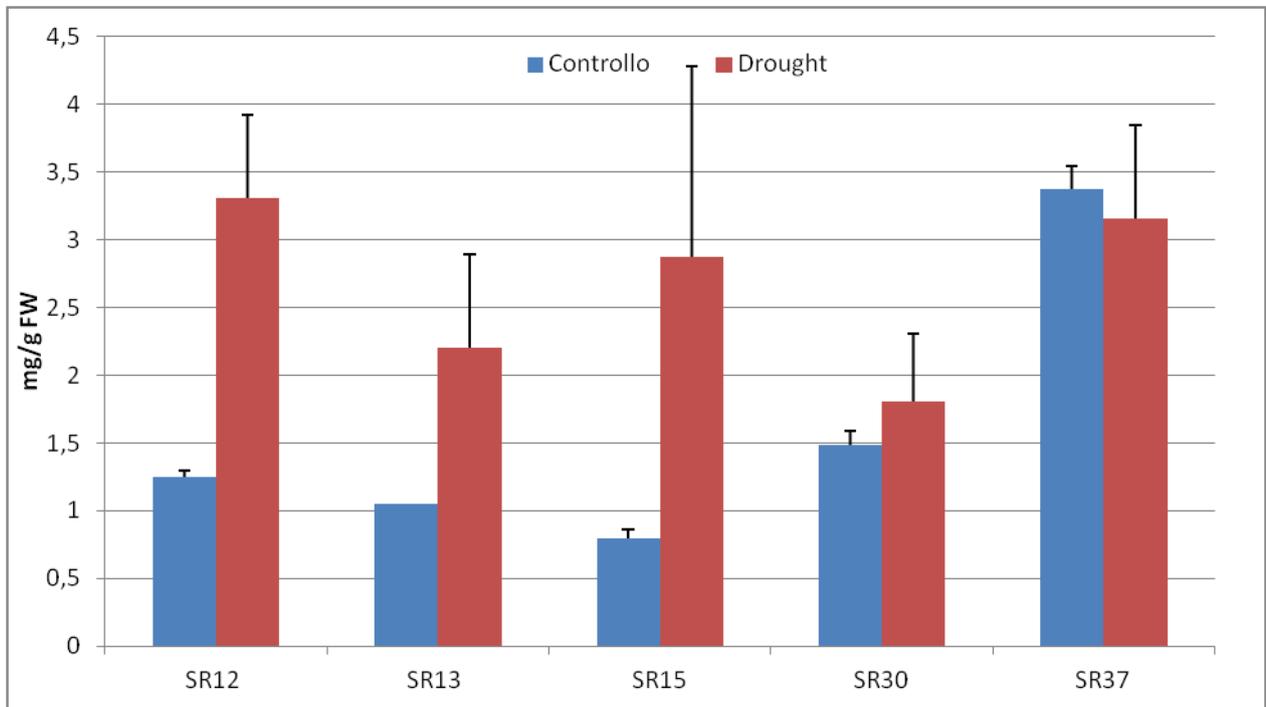


Figura 5: Contenuto in Prolina in foglie di piante di pomodoro controllo (blu) e *Drought* (rosso) allevate in campo. I risultati mostrati si riferiscono all'esperimento condotto nell'anno 2012.

Come mostrato in Fig. 5, nella quale sono riportati i dati dell'esperimento realizzato nel 2012 rappresentativo dell'andamento anche degli altri anni, i diversi genotipi mostrano un contenuto di prolina nelle piante controllo e nelle piante *drought* molto eterogeneo, dimostrando le differenze tra i vari genotipi. In generale infatti i livelli di prolina aumentano del 30-100% in condizioni di stress idrico. Il genotipo da industria determinato SR30 mostra livelli di prolina di partenza bassi intorno ai 1,48 mg per grammo di tessuto fresco, ma soprattutto un incremento ridotto a seguito dello stress del 18%.

3.1.1.d Conservabilità dei frutti

E' stato valutato l'effetto delle condizioni di allevamento a ridotto input idrico sulla conservabilità (*shelf life*) dei frutti di pomodoro dei genotipi presi in esame. In particolare sono state effettuate prove di sovraturazione dei frutti mediante valutazione del numero dei frutti conservabili ed un'analisi della perdita di peso e consistenza del frutto durante il periodo di post-raccolta.

Sovramaturazione dei frutti

A tal fine 50 frutti di pomodoro prodotti da ogni genotipo sono stati raccolti, pesati e conservati in camere ventilate, con basso grado di umidità ed a una temperatura di 18-23°C. I risultati ottenuti (Fig. 6) hanno chiaramente mostrato che i frutti di pomodoro dei genotipi da industria SR30 e SR43 presentano una scarsa conservabilità con perdita di oltre il 50% dei frutti dopo 37 giorni e con nessun frutto conservabile dopo 60 giorni dalla raccolta. Per questi genotipi non sono osservabili differenze significative tra pomodori raccolti da piante irrigate e piante *drought*.

Al contrario i pomodori da serbo dal colore rosso SR31 e SR34 presentano una conservabilità maggiore, perdendo la totalità dei frutti dopo 147 giorni per quanto riguarda quelli irrigati e dopo 6 mesi per quanto riguarda le piante non irrigate. Infine i pomodori da serbo di colore giallo, presentano le migliori performance di conservabilità, il genotipo SR12 infatti conserva la quasi totalità dei frutti (solo il 6% è stato perso) per tutti i 6 mesi di osservazione, indipendentemente dall'irrigazione o meno delle piante.

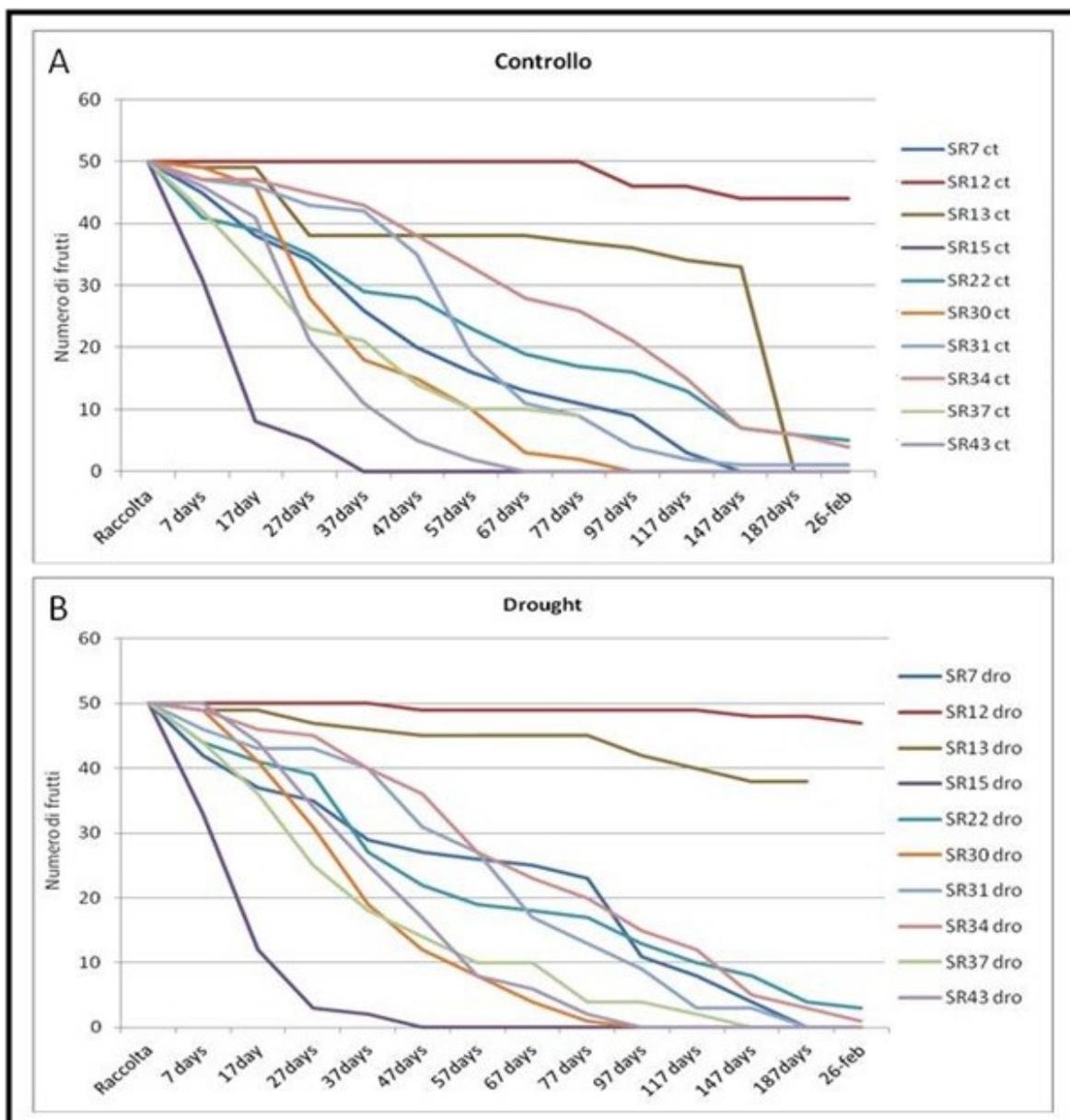


Figura 6: Conservabilità dei frutti di piante di pomodoro dei genotipi indicati allevate in campo in condizioni controllo e Drought fino a 6 mesi dalla raccolta.

Compattezza dei frutti

Al termine del periodo di allevamento, 50 frutti di pomodoro prodotti da ogni genotipo (25 per il genotipo SR34) sono stati raccolti, pesati e conservati in condizioni controllate. A cadenza settimanale prima e mensile poi 10 frutti sono stati pesati ed è stata determinata la compattezza attraverso l'utilizzo dello strumento AGROSTA®100Field. Al termine delle misurazioni i pomodori marci sono stati eliminati al fine del conteggio totale.

Tabella 7: Analisi della conservazione (numero di frutti conservati, peso e compattezza) dei frutti di piante di pomodoro dei genotipi indicati allevati in campo in condizioni controllo (Ct) e *Drought*.

| Genotipo | | SR 12 | | SR 31 | | SR 34 | | SR 37 | | SR 43 | |
|----------|-------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| | | Ct | Drought |
| Raccolta | N. Frutti | 50 | 50 | 50 | 50 | 25 | 25 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | Peso Medio (g) | 26,82 | 15,08 | 14,92 | 10,80 | 14,43 | 9,32 | 11,19 | 10,79 | 57,63 | 54,24 |
| | Durezza Media (g) | 71,30 | 70,70 | 55,60 | 63,40 | 58,00 | 63,00 | 38,50 | 45,70 | 66,60 | 67,90 |
| I sett. | N. Frutti | 50 | 49 | 38 | 23 | 16 | 16 | 10 | 20 | 4 | 7 |
| | Peso Medio (g) | 25,20 | 13,82 | 13,58 | 9,06 | 13,64 | 8,85 | 9,17 | 8,92 | 36,32 | 35,16 |
| | Durezza Media (g) | 73,10 | 71,00 | 44,00 | 45,50 | 36,80 | 42,50 | 45,85 | 52,10 | 62,20 | 56,92 |
| I mese | N. Frutti | 47 | 47 | 11 | 12 | 3 | 12 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| | Peso Medio (g) | 76,80 | 70,67 | 11,60 | 9,40 | 10,33 | 12,10 | - | - | 32,33 | 28,00 |
| | Durezza Media (g) | 26,20 | 14,33 | 45,85 | 44,00 | 36,67 | 44,45 | - | - | 50,83 | 47,50 |
| III mese | N. Frutti | 31 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Peso Medio (g) | 18,20 | 15,52 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Durezza Media (g) | 75,05 | 71,43 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Come evidenziato in Tab. 7, il genotipo SR12 ha conservato i frutti per tutti i 3 mesi di osservazione; i frutti di questo genotipo sono rimasti integri fino a 5 mesi dalla raccolta (dato non mostrato). Inoltre frutti di questo genotipo prelevati sia da piante controllo che da piante *drought* presentano una maggiore consistenza rispetto gli altri genotipi.

Gli altri genotipi presi in esame hanno perso tutti i frutti entro il secondo mese di osservazione. L'analisi della durezza dei frutti ha indicato che i genotipi indeterminati rossi (SR31, SR34, SR37) presentano, frutti dalla consistenza, almeno nelle misurazioni iniziali, maggiore nelle piante allevate a regime idrico ridotto.

I frutti prelevati dal genotipo determinato SR43 hanno mostrato una rapida perdita della consistenza dei frutti (24% e 29% rispettivamente per le piante controllo e

drought) e una perdita del peso fresco di circa il 44% e 51% nei frutti da piante controllo e *drought*.

3.1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA A CONDIZIONI DI STRESS IDRICO DI GENOTIPI DI POMODORO ALLEVATI IN CONDIZIONI CONTROLLATE

Nel periodo Aprile - Luglio 2014, quattro varietà di pomodoro: Giallo Beneventano (SR12), Crovarese (SR31), Lucariello (SR34) e Red Setter (SR43), sono state selezionate per l'allevamento in condizioni di irrigazione controllata in serra al fine di caratterizzarle a livello fisiologico, biochimico e molecolare e studiarne il comportamento in condizioni di crescita a ridotto input idrico. A tale scopo piantine di pomodoro, dei quattro genotipi, sono state allevate in vasi contenenti terreno per 30 giorni. Successivamente le piante sono state suddivise in due gruppi: piante controllo irrigate a pieno regime per tutta la durata dell'esperimento, e piante *drought* che hanno seguito un preciso schema sperimentale rappresentato schematicamente in Fig. 8. In particolare le piante sono state sottoposte a un primo ciclo di stress in cui alle piante *drought* è stata interrotta l'irrigazione fin quando i valori di conduttanza stomatica non sono drasticamente diminuiti (13° giorno dall'interruzione dall'irrigazione, stadio S1); una fase di recupero (RW, *Rewatering*) cui dopo 16 giorni d'imposizione dello stress idrico è stata ripresa l'irrigazione delle piante fino al raggiungimento di valori di conduttanza simili a quelli delle piante controllo (15° giorno dalla ripresa dell'irrigazione). Un secondo ciclo di stress in cui le piante dopo il *rewatering* sono state nuovamente sottoposte alla privazione di irrigazione per 9 giorni (S2). Al termine della fase di S2 le piante *drought* sono state irrigate con il 30%

dell'acqua utilizzata per le piante controllo al fine di arrivare alla conclusione del ciclo produttivo.

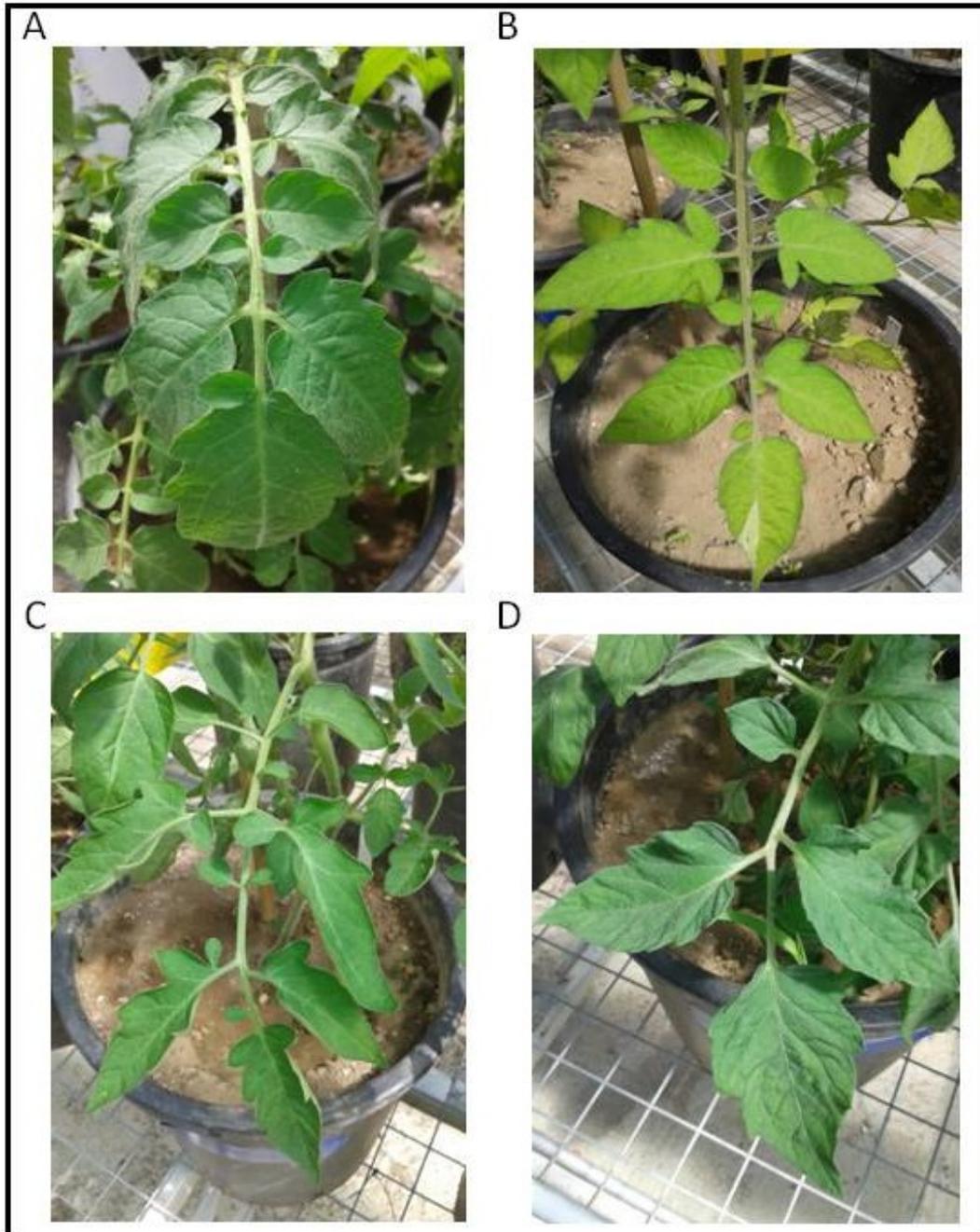


Figura 7: Dettaglio delle foglie dei 4 genotipi utilizzati per l'allevamento in Serra; A (Giallo beneventano), B (Crovarese), C (Lucariello), D (Red Setter).

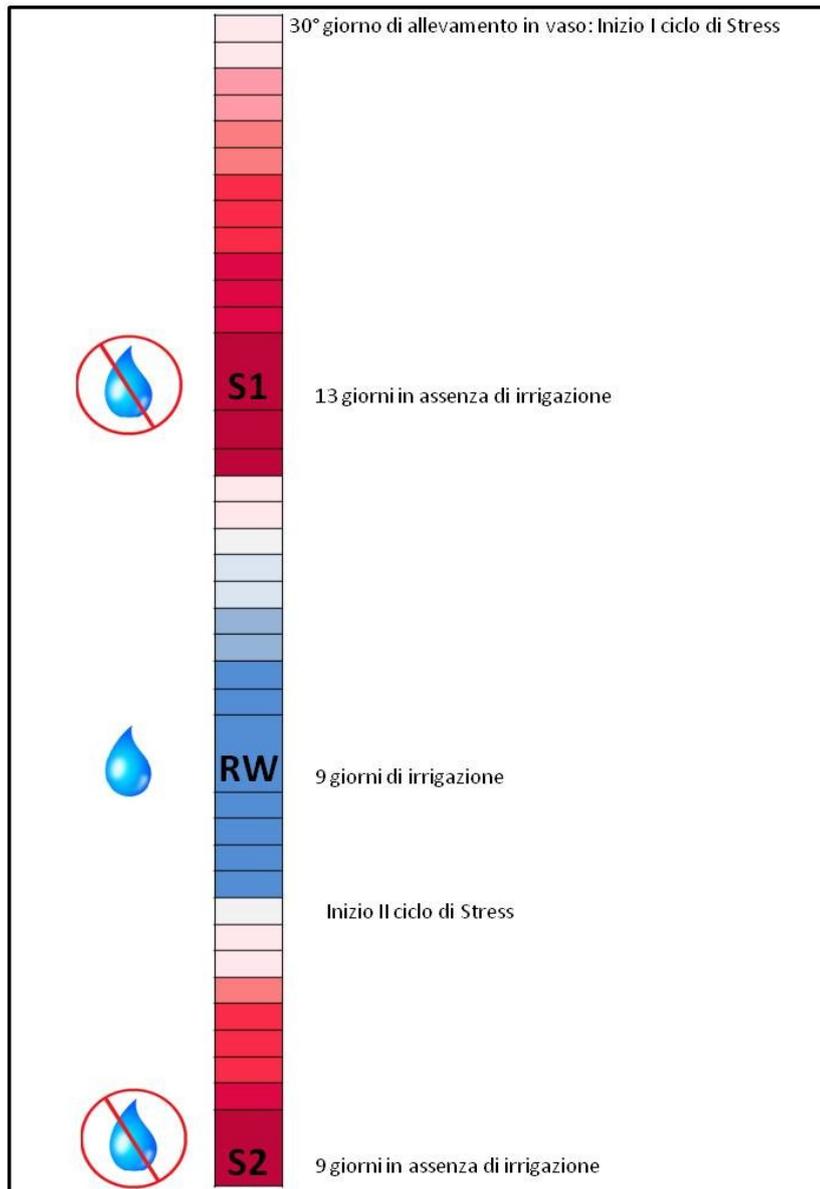


Figura 8: Rappresentazione schematica del piano sperimentale seguito per la caratterizzazione della risposta di genotipi di pomodoro a stress idrico imposto in piante allevate in serra dei genotipi SR12, SR31, SR34, SR43. Prelievi di foglie sono stati effettuati allo stadio S1 (13 giorni in assenza di irrigazione); allo stadio RW (9 giorni di rewatering); allo stadio S2 (9 giorni nuovamente in assenza di irrigazione).

3.1.2.a Caratterizzazione fisiologica

Per ciascuno dei genotipi in esame, nelle fasi di imposizione dello stress e di *rewatering* sono stati valutati, in collaborazione con l'istituto CNR-ISAFOM di Ercolano, alcuni parametri fisiologici quali la conduttanza stomatica (gs), l'attività fotosintetica

(A) e indice di area fogliare (LAI). Le analisi di conduttanza stomatica e attività fotosintetica sono state effettuate mediante l'utilizzo dell'analizzatore Licor-6400 negli stadi S1 e RW. I risultati hanno mostrato la riduzione significativa degli scambi gassosi e della capacità di fotosintesi in tutte le piante allevate in assenza di irrigazione confermando lo stato di stress. Come mostrato in Fig. 9 la carenza idrica induce nello stadio S1 la totale chiusura degli stomi, e all'assenza di scambi gassosi nelle foglie consegue una parallela riduzione dell'attività fotosintetica misurata attraverso l'assimilazione della CO₂, che risulta fortemente compromessa (Fig. 10). Durante la fase di recupero (RW), al ristabilirsi delle ottimali condizioni di irrigazione, le piante dei genotipi indeterminati hanno mostrato valori di conduttanza stomatica e attività fotosintetica paragonabili a quelli delle piante controllo, indicando che il sistema fotosintetico durante lo stress idrico non ha subito danni irreversibili. Le piante *drought* del genotipo determinato SR43 hanno mostrato una minore capacità di recupero a seguito della prima fase di stress.

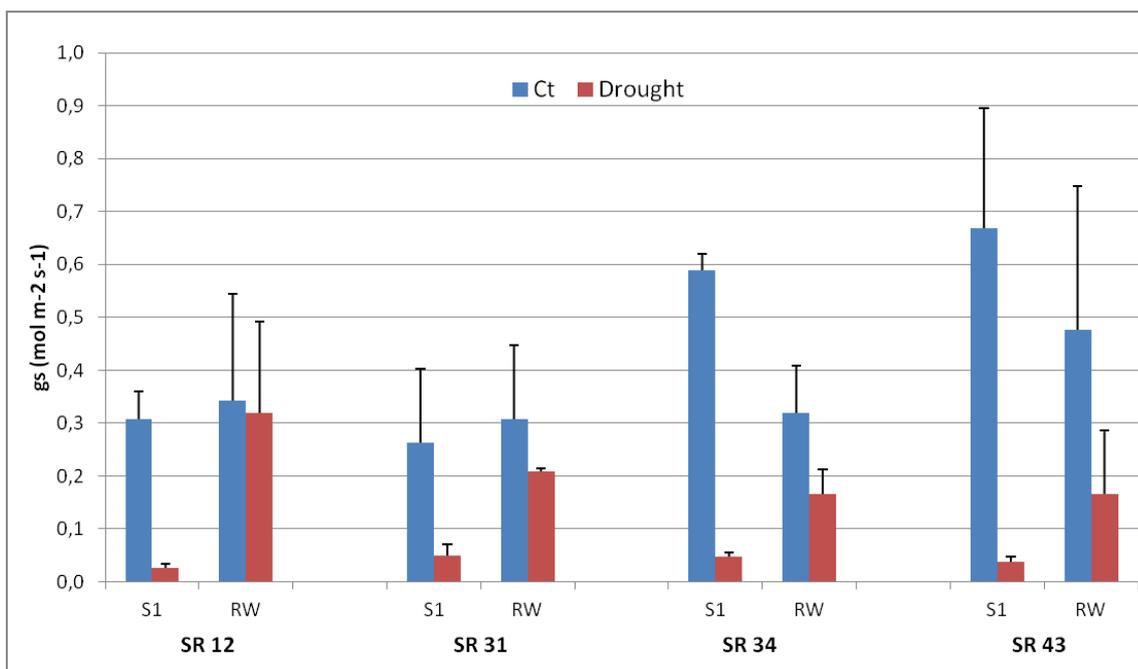


Figura 9: Conduttanza stomatica (gs) delle foglie di piante allevate in serra in condizioni controllo (blu) e Drought (rosso) nelle fasi sperimentali S1 (13 giorni in assenza di irrigazione) e RW (9 giorni di recupero).

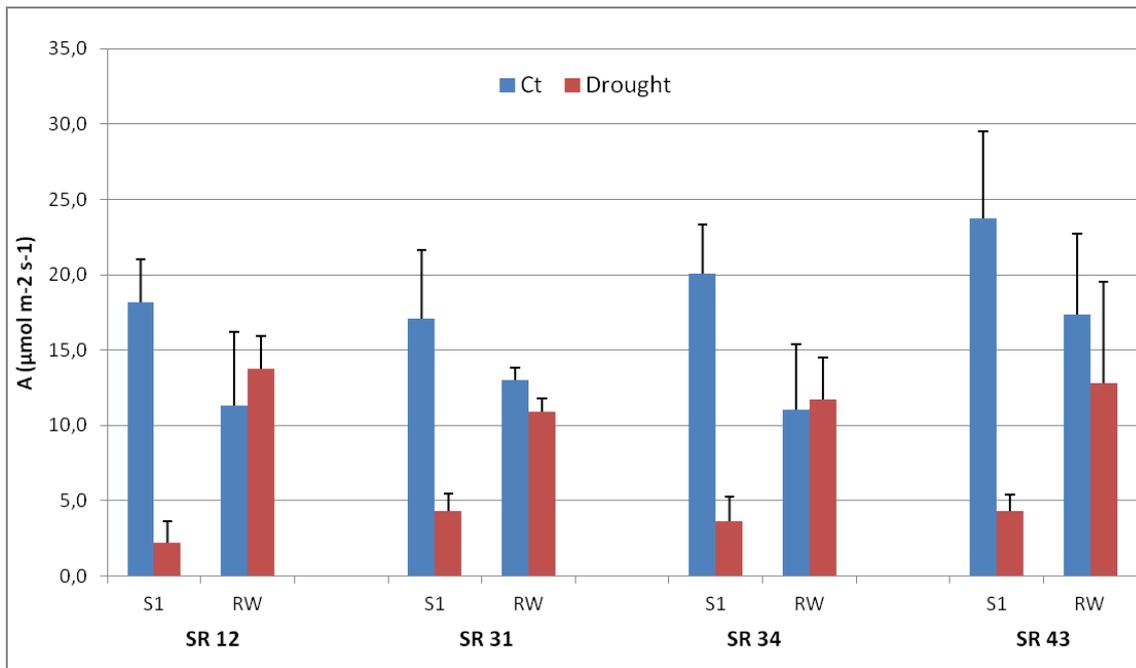


Figura 10: Assimilazione fotosintetica (A) delle foglie di piante allevate in serra in condizioni controllo (blu) e Drought (rosso) nelle fasi sperimentali S1 (13 giorni in assenza di irrigazione) e RW (9 giorni di recupero).

E' stato inoltre valutato l'indice di area fogliare (LAI) un parametro molto importante per la valutazione dell'effetto dello stress idrico sull'espansione fogliare. A tale scopo a fine del ciclo di allevamento sulle piante del gruppo controllo e *drought* dei genotipi in esame è stata misurata la superficie fogliare acquisendo l'immagine con uno scanner (LI – 3400 area meter) ed è stata calcolata la superficie fogliare media per pianta.

L'analisi del LAI (Fig. 11) ha evidenziato che lo sviluppo fogliare è fortemente influenzato dalle condizione di deficit idrico. L'area fogliare delle piante *drought* sottoposte a ciclo di *stress-recovery-stress* è risultata dalle 2 alle 4 volte inferiore quella delle piante controllo a conferma della severità dello stress imposto. Relativamente a questo parametro la varietà che ha subito in maniera ridotta l'effetto dello stress imposto è stato il genotipo giallo SR12. I genotipi dai frutti rossi SR31, SR34 e SR43 hanno mostrato invece una differenza maggiore tra piante non irrigate e piante irrigate, di 3,9, 3,1 e 3,0 volte rispettivamente.

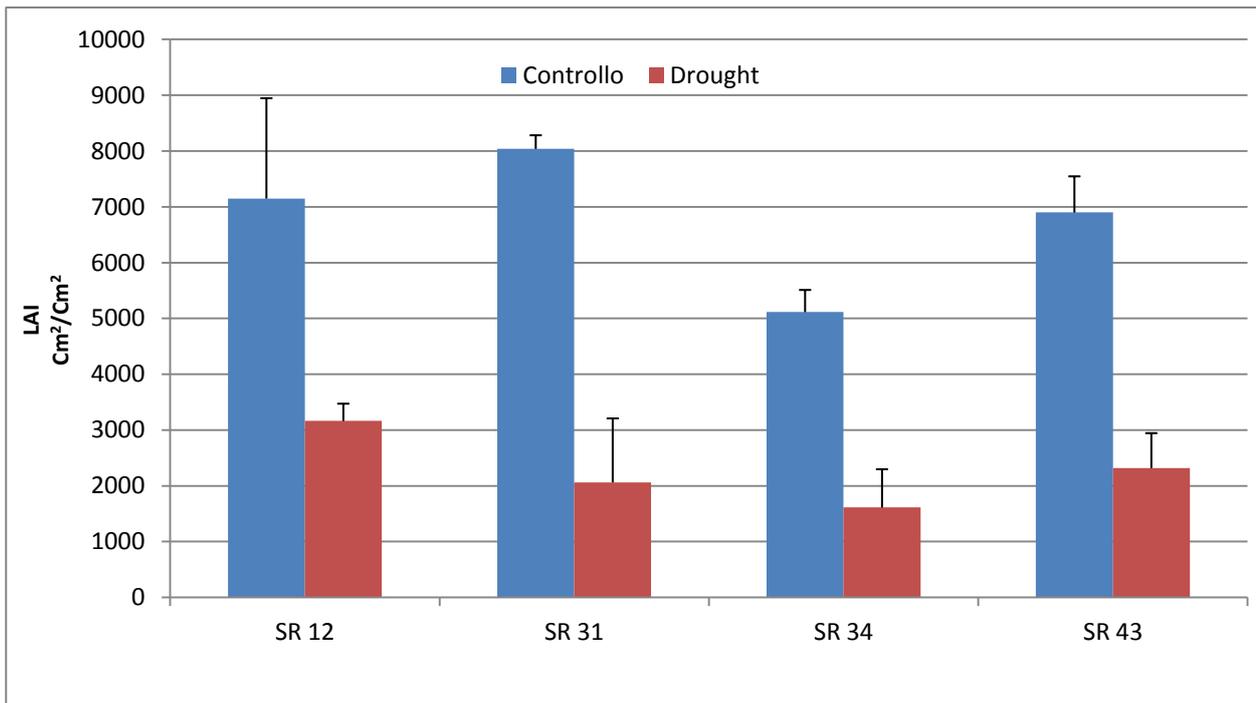


Figura 11: Indice di area fogliare (LAI) di piante allevate in serra in condizioni controllo (blu) e di stress idrico (rosso) nei genotipi indicati. La misurazione è stata effettuata alla fine del ciclo di allevamento.

3.1.2.b Caratterizzazione biochimica

La caratterizzazione a livello biochimico dei quattro genotipi in esame ha riguardato la determinazione dei livelli nelle foglie di Acido Abscissico (ABA) e di Prolina, entrambi importanti componenti della complessa catena di eventi attivata dai segnali di stress osmotico. Al tal fine le foglie di ogni genotipo sono state prelevate in triplicato sia per le piante irrigate che per quelle *drought* nelle fasi sperimentali S1, RW e S2.

Prolina

La determinazione dei livelli di Prolina libera nelle foglie è stata effettuata attraverso il metodo di Clausen (2005). I risultati (Fig. 12) hanno evidenziato un aumento dei livelli di prolina libera nei campioni di foglie prelevati negli stadi S1 e S2 da piante *drought*. Differenze tra i genotipi sono state riscontrate sia nei livelli basali di prolina nelle piante controllo sia nell'accumulo di prolina indotto da stress nei due stadi S1 e S2.

Difatti i genotipi indeterminati presentano nelle piante controllo livelli di prolina più alti rispetto quelle del genotipo determinato e l'incremento nelle piante *drought* a seguito della privazione d'acqua risulta essere maggiore. In particolare nello stadio S2 i genotipi indeterminati SR12, SR31 e SR34 mostrano un aumento dei livelli di prolina di 5, 5 e 4 volte rispettivamente mentre il genotipo determinato SR 43 mostra un incremento di 3 volte. Dopo la fase di recupero RW, tutti i genotipi hanno mostrato livelli di prolina comparabili a quelli delle piante controllo.

Acido Abscissico

I risultati della determinazione del contenuto in Acido Abscissico in campioni di foglie, effettuata mediante saggio ELISA (Fig. 13), hanno chiaramente mostrato un aumento di ABA fogliare in risposta a condizioni di stress idrico prolungato (Stress 1 e Stress2). In particolare i livelli di ABA aumentano in seguito a stress di 2 e 2,5 volte negli ecotipi SR31 e SR34 mentre nei genotipi SR 12 e SR43 si evidenzia un accumulo di ABA di 4 e 5 volte rispetto ai valori determinati nelle piante controllo. Durante la fase di *rewatering* (RW) tutti i genotipi mostrano livelli di ABA nelle foglie delle piante *drought* paragonabili a quelli delle foglie di piante irrigate ciò a conferma dell'effettivo recupero fisiologico post-stress avvenuto durante la fase di recupero. E'infine interessante evidenziare che l'accumulo di ABA nello stadio S2 è inferiore a quanto evidenziato in quello S1, probabilmente a causa dell'attivazione di meccanismi di adattamento.

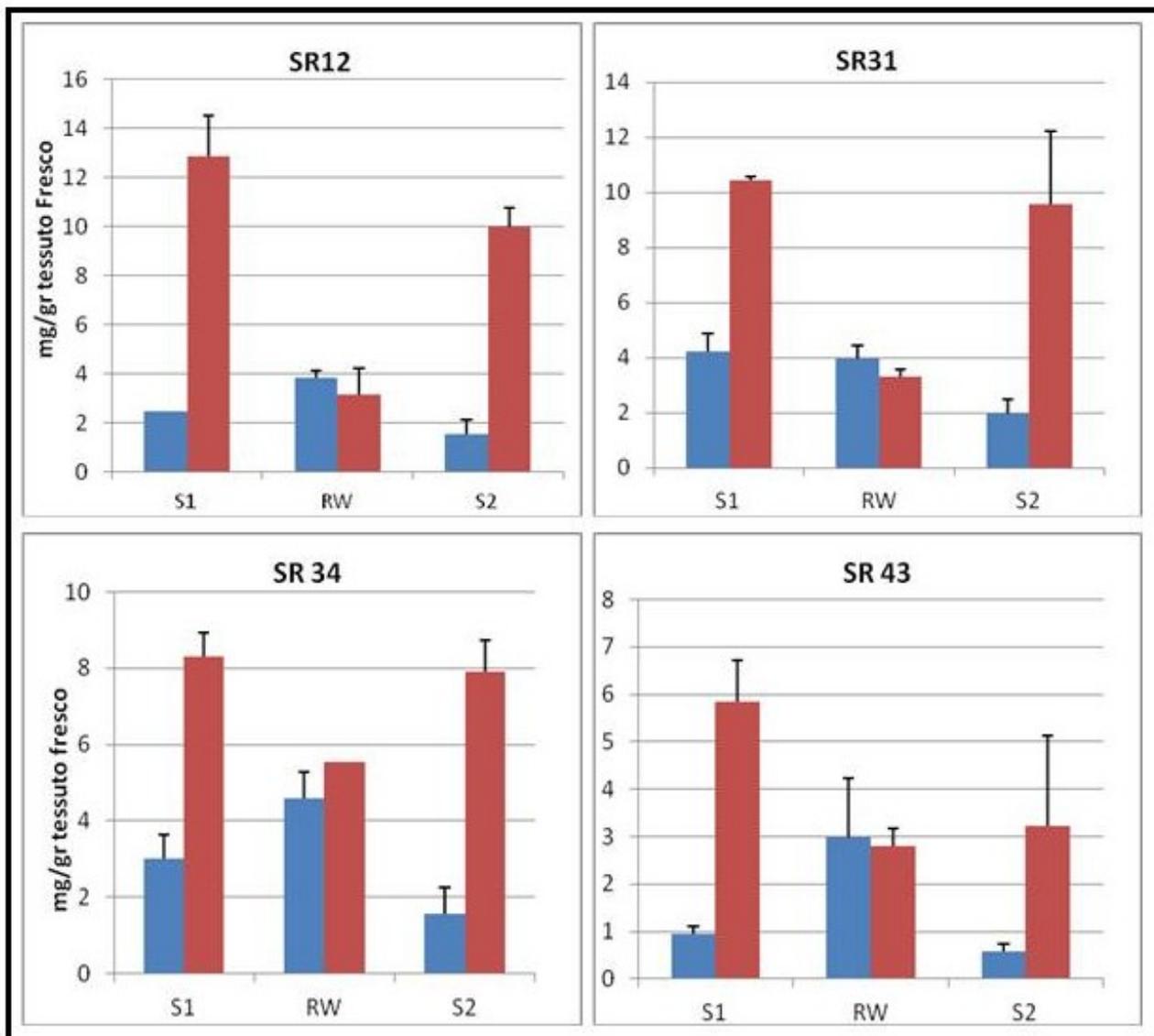


Figura 12: Contenuto di Prolina libera in foglie di pomodoro prelevate da piante allevate in condizioni controllo (blu) e piante Drought (rosse) nei genotipi studiati. Le analisi sono state effettuate ai punti sperimentali S1, RW e S2.

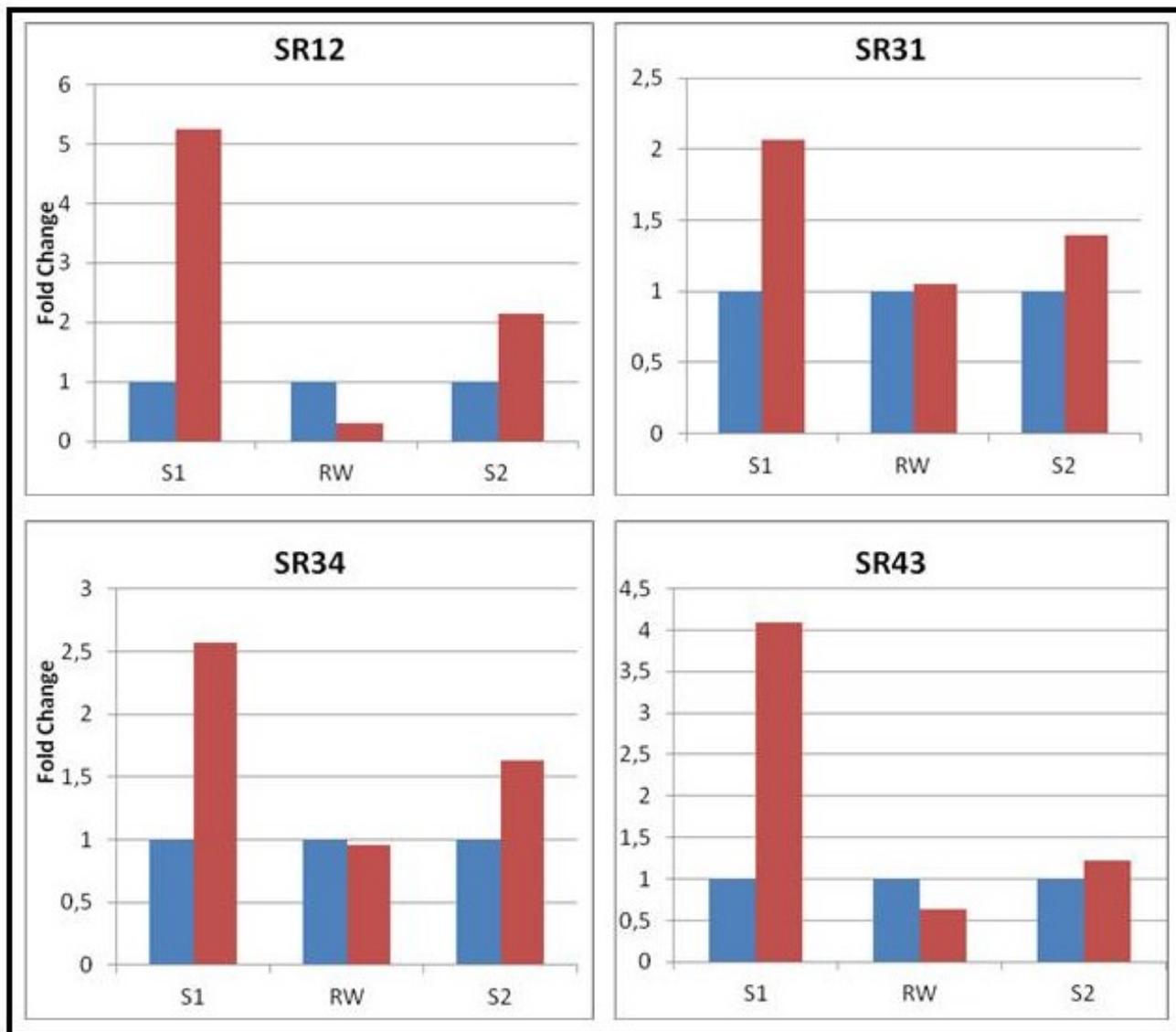


Figura 13: Variazione del contenuto di Acido Abscissico in foglie di pomodoro prelevate da piante controllo (blu) e piante Drought (rosse). I valori rappresentano di ABA sono espressi come rapporto delle picomoli/grammi di tessuto verde delle piante drought su quelle controllo. Le analisi sono state effettuate ai punti sperimentali S1, RW e S2.

3.1.3 STUDIO DELLE VARIAZIONI DEL TRASCRITTOMA IN RISPOSTA A STRESS IDRICO MEDIANTE RNA SEQUENCING

Al fine di studiare i meccanismi molecolari alla base della risposta alle condizioni di stress idrico imposto ed identificare funzioni geniche chiave coinvolte nelle modificazioni fisiologiche descritte, i genotipi Crovarese (SR31) e Lucariello (SR34), sono stati selezionati per un'analisi trascrittomica su larga scala mediante *RNA sequencing (RNA-seq)*. Campioni in triplicato di foglie prelevate da piante controllo e piante *drought* (Stadio S1; 13 giorni in assenza di irrigazione), sono stati utilizzati per l'estrazione di RNA e successiva elettroforesi capillare su chip tramite Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer) per analizzarne la qualità e il RIN (*RNA integrity number*). In Fig. 14 è riportato un esempio dei risultati dell'elettroforesi. Solo i campioni di RNA che presentavano un valore di RIN superiore a 5,5 sono stati utilizzati per il sequenziamento (Tab. 8).

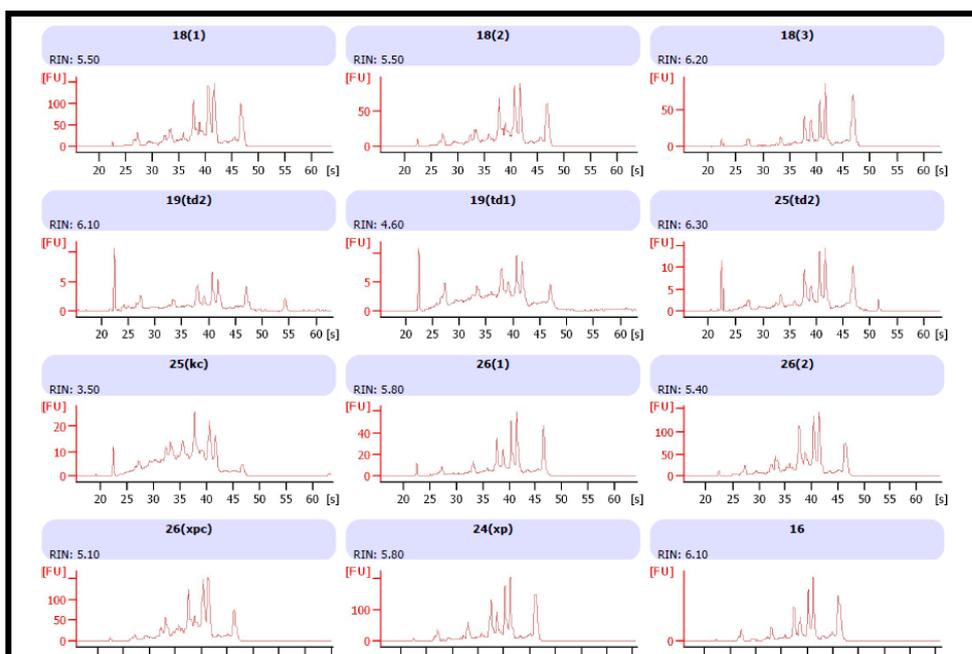


Figura 14: Valutazione della qualità degli RNA estratti per l'analisi RNA-seq. Esempi di output ottenuti dall'elettroforesi capillare per alcuni campioni utilizzati per il sequenziamento. E' possibile osservare alcuni elettroferogrammi positivi con valori di RIN superiori al 5,5 e altri negativi scartati ai fini dell'analisi.

Tabella 8: Tabella riassuntiva dei campioni utilizzati per l'analisi RNA-seq, relativi codici e qualità RIN (RNA integrity number).

| Codice | Genotipo | Trattamento | Replica | Punto sperimentale | RIN |
|---------------|-----------------|--------------------|----------------|---------------------------|------------|
| #15 | SR31 Crovarese | Controllo | 1 | S1 | 6,1 |
| #16 | SR31 Crovarese | Controllo | 2 | S1 | 6,1 |
| #17 | SR31 Crovarese | Controllo | 3 | S1 | 5,7 |
| #18 | SR31 Crovarese | <i>Drought</i> | 1 | S1 | 6,3 |
| #19 | SR31 Crovarese | <i>Drought</i> | 2 | S1 | 6,1 |
| #20 | SR31 Crovarese | <i>Drought</i> | 3 | S1 | 6,6 |
| #21 | SR34 Lucariello | Controllo | 1 | S1 | 6 |
| #22 | SR34 Lucariello | Controllo | 2 | S1 | 6,3 |
| #23 | SR34 Lucariello | Controllo | 3 | S1 | 6,1 |
| #24 | SR34 Lucariello | <i>Drought</i> | 1 | S1 | 5,9 |
| #25 | SR34 Lucariello | <i>Drought</i> | 2 | S1 | 6,3 |
| #26 | SR34 Lucariello | <i>Drought</i> | 3 | S1 | 5,8 |

Le varie fasi di preparazione delle librerie e del sequenziamento sono state effettuate tramite strumentazione ILLUMINA, presso la spin-off dell'Università degli studi di Salerno GENOMIX 4 LIFE.

3.1.3.a Analisi bioinformatiche dei risultati di RNA sequencing

Una volta disponibili i dati di sequenza, questi sono stati elaborati ed analizzati presso il laboratorio di Bioinformatica della SEQUENTIA Biotech di Barcellona (Campus UAB - Barcellona, Spain) presso la quale è stato svolto uno stage formativo per analisi di dati provenienti da tecnologie NGS (*Next Generation Sequencing*). Le sequenze grezze (*raw reads*) sono state preliminarmente scaricate su i server della SEQUENTIA Biotech e i file successivamente decompressi. Come mostrato in Fig. 15, al fine dell'analisi delle *reads* è stata seguita una pipeline comprendente diversi *tools* bioinformatici.

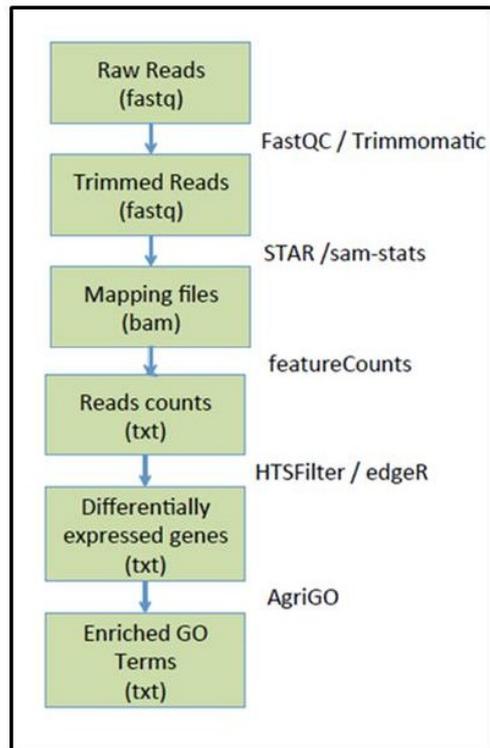


Figura 15: Pipeline dei vari passaggi effettuati e software utilizzati per l'analisi bioinformatica dei dati di RNA-sequencing.

Questa *pipeline* ha previsto un controllo della qualità del sequenziamento mediante l'utilizzo del *software* FAST QC dal quale è possibile ottenere una serie informazioni quali: *Per base sequence quality, per tile sequence quality, per sequence quality score, per base sequence content, per sequence gc content, per base n content, sequence length distribution, sequence duplication levels*, che identificano la qualità delle sequenze. Successivamente è stato utilizzato il *software* Trimmomatic, per eliminare le porzioni di sequenza che presentavano basi di bassa qualità e per allontanare le porzioni di sequenza derivate dal sequenziamento degli adattatori Illumina. E' stata quindi controllata la qualità delle sequenze *post-trimming*, utilizzando nuovamente il *software* FAST QC. Come mostrato nella Tab. 9, il processo di Trimming ha conservato mediamente il 99,7% delle sequenze grezze. Lo 0,3% di sequenze di qualità troppo bassa è stato scartato e non utilizzato per le successive analisi.

Tabella 9: Tabella riassuntiva dei numeri relativi le reads sequenziate in fase di pre- e post- "trimming".

| Crovarese | Pre-Trimming | | Post-Trimming | | Dropped Reads | % Dropped reads | % Reads remained |
|------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|
| | Total Sequence | Sequence length | Total Sequence | Sequence length | | | |
| Controllo | | | | | | | |
| #15 | 51744895 | 101 | 51627479 | 35-91 | 117416 | 0,23 | 99,77 |
| #16 | 38582054 | 101 | 38500577 | 35-91 | 81477 | 0,21 | 99,79 |
| #17 | 37145045 | 101 | 37058429 | 35-91 | 86616 | 0,23 | 99,77 |
| Drought | | | | | | | |
| #18 | 46863980 | 101 | 46767646 | 35-91 | 96334 | 0,21 | 99,79 |
| #19 | 43795607 | 101 | 43698481 | 35-91 | 97126 | 0,22 | 99,78 |
| #20 | 31585095 | 101 | 31500018 | 35-91 | 85077 | 0,27 | 99,73 |
| Lucariello | Pre-Trimming | | Post-Trimming | | Dropped Reads | % Dropped reads | % Reads remained |
| | Total Sequence | Sequence length | Total Sequence | Sequence length | | | |
| Controllo | | | | | | | |
| #21 | 33033148 | 101 | 32893460 | 35-91 | 139688 | 0,42 | 99,58 |
| #22 | 40346136 | 101 | 40165399 | 35-91 | 180737 | 0,45 | 99,55 |
| #23 | 39046612 | 101 | 38920230 | 35-91 | 126382 | 0,32 | 99,68 |
| Drought | | | | | | | |
| #24 | 38160086 | 101 | 38015039 | 35-91 | 145047 | 0,38 | 99,62 |
| #25 | 32316174 | 101 | 32202223 | 35-91 | 113951 | 0,35 | 99,65 |
| #26 | 42329656 | 101 | 42174419 | 35-91 | 155237 | 0,37 | 99,63 |

Successivamente le sequenze sono state mappate contro il genoma di riferimento della varietà Heinz (versione SL2.5 – *Tomato Genome Consortium* 2012). Inoltre tutte le sequenze sono state mappate nuovamente anche contro i genomi specifici degli ecotipi Lucariello e Crovarese i cui genomi sono stati recentemente sottoposti a ri-sequenziamento (dato non pubblicato) nell'ambito del progetto MIUR-PON GenopomPro e al quale ha partecipato il CNR-IBBR di Portici.

Per l'analisi di mappaggio, in entrambi i casi, è stato prima utilizzato il *software* STAR che ha identificato le sequenze che cadevano all'interno dei geni di *Solanum lycopersicum*, successivamente queste sono state contate attraverso il *software* Features Count. Per analizzare la qualità del mappaggio è stato utilizzato il *software* SAM TOOLS che ha indicato che mediamente il 98% delle sequenze mappate aveva una qualità MAPQ (*mapping qualities*) maggiore di 30. In particolare il mappaggio su genomi differenti ha permesso di capire che l'utilizzo dei genomi specifici identifica un

numero di “*uniquely mapped reads*” aumentato mediamente del 1.5 – 2,5 %. Questa percentuale corrisponde a milioni di *reads* in più utilizzate ai fini dell’analisi, e questo ha permesso di migliorare la sensibilità e la specificità dei risultati.

In tutti i casi il processo di *mapping* ha indicato che almeno il 93 % delle sequenze mappava univocamente sul genoma utilizzato come riferimento e quindi, essendo questa percentuale idonea, le sequenze che mappavano in posizione multiple nel genoma non state prese in considerazione per le analisi successive (Tab. 10).

Tabella 10: Tabella riassuntiva delle statistiche di mappaggio utilizzando genomi di pomodoro di varietà differenti come riferimento.

| | | Uniquely Mapped reads (%) | Multiple Mapping Reads (%) | Unmapped (%) | Uniquely Mapped reads (%) | Multiple Mapping Reads (%) | Unmapped (%) |
|---------------|-----------------|---------------------------|----------------------------|--------------|--------------------------------|----------------------------|--------------|
| Sample | Genotipo | Mappaggio vs Heinz | | | Mappaggio vs Crovarese | | |
| #15 | CRO | 94,23 | 1,19 | 4,59 | 95,68 | 1,39 | 2,93 |
| #16 | CRO | 95,15 | 1,36 | 3,5 | 96,13 | 1,55 | 2,32 |
| #17 | CRO | 93,36 | 2,14 | 4,51 | 94,52 | 2,41 | 3,07 |
| #18 | CRO | 95,36 | 1,01 | 3,64 | 96,47 | 1,19 | 2,34 |
| #19 | CRO | 94,76 | 1,29 | 3,95 | 95,73 | 1,49 | 2,78 |
| #20 | CRO | 93,88 | 1,06 | 5,06 | 94,66 | 1,23 | 4,11 |
| Sample | Genotipo | Mappaggio vs Heinz | | | Mappaggio vs Lucariello | | |
| #21 | LUC | 90,43 | 3,23 | 6,34 | 92,62 | 3,65 | 3,73 |
| #22 | LUC | 93,9 | 1,9 | 4,21 | 95,51 | 2,1 | 2,39 |
| #23 | LUC | 92,6 | 2 | 5,41 | 94,39 | 2,23 | 3,38 |
| #24 | LUC | 92,5 | 1,78 | 5,71 | 94,5 | 2,01 | 3,49 |
| #25 | LUC | 92,36 | 1,44 | 6,21 | 94,11 | 1,63 | 4,26 |
| #26 | LUC | 92,96 | 1,91 | 5,14 | 94,65 | 2,13 | 3,22 |

Ultimato il conteggio delle liste di geni, queste sono state esportate per essere analizzate statisticamente utilizzando il linguaggio di scrittura R. E’ stata analizzata la riproducibilità dei dati tra le repliche biologiche effettuando l’analisi delle componenti principali (PCA). I risultati della PCA hanno chiaramente indicato che alcune delle repliche biologiche (#17, #23, #24) discostavano troppo dalle altre relative allo stesso trattamento e pertanto sono state eliminate (Fig. 16).

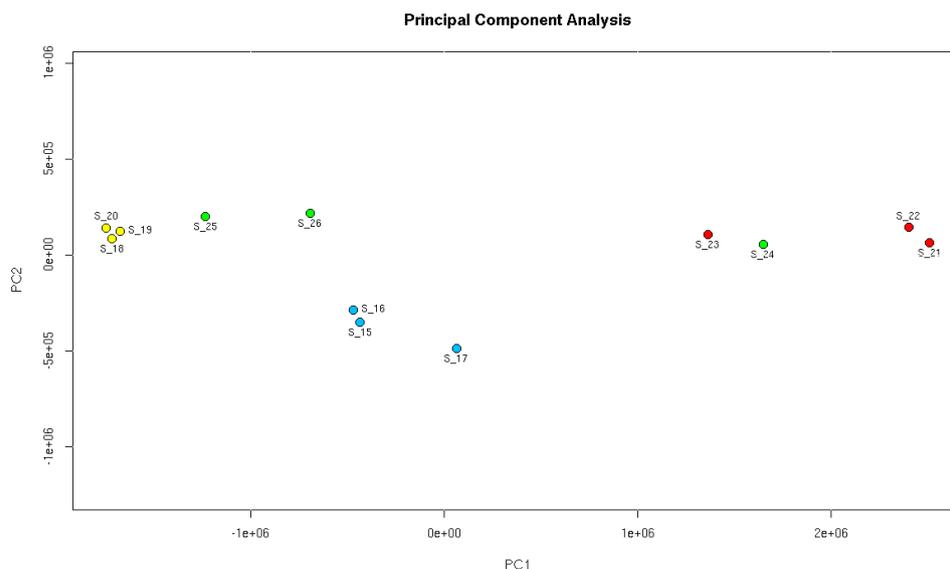


Figura 16: Analisi delle componenti principali (PCA), utilizzando i dataset delle reads contate all'interno dei geni nelle varie repliche biologiche. In azzurro e giallo sono mostrati i campioni controllo e *drought* del genotipo Crovarese; in rosso e verde sono mostrati i campioni controlli e *drought* del genotipo Lucariello.

Successivamente è stato utilizzato il pacchetto di R Hts Filter per effettuare l'analisi statistica, mediante il metodo della TMM (*Trimmed mean*), e filtrare esclusivamente i geni che erano realmente differenzialmente espressi. Infine è stato utilizzato il pacchetto di R EdgeR allo scopo di analizzare i confronti tra campioni controllo e campioni trattati e ottenere le liste dei geni differenzialmente espressi (DEG) selezionando solamente quelli che presentavano un valore di FDR (*False Discovery Rate*) > 0,05.

3.1.3.b Identificazione e analisi dei geni differenzialmente espressi

L'utilizzo della tecnica dell'*RNA sequencing* su campioni di foglie di pomodoro allevate in condizioni di ridotto input idrico ha permesso l'identificazione in media tra i due mappaggi di 6859 DEGs per il genotipo Crovarese e di 4624 DEGs per il genotipo Lucariello. In particolare sono stati identificati 2851 geni regolati positivamente (up

regolati) in condizioni di stress idrico nel genotipo Crovarese e di 1920 geni regolati positivamente nel genotipo Lucariello utilizzando come riferimento il genoma di Heinz (Fig. 17). Di questi 1432 geni sono risultati essere up regolati in entrambi i genotipi. Alternativamente sono stati identificati 4000 geni regolati negativamente (down regolati) in condizioni di stress idrico nel genotipo Crovarese e di 2642 geni nel genotipo Lucariello. Di questi, 2297 geni sono risultati essere down-regolati in entrambi i genotipi. Simili risultati sono stati ottenuti dall'analisi dei DEGs utilizzando i genomi specifici. Per quanto riguarda il genotipo Crovarese sono risultati differenzialmente espressi 2954 geni up-regolati e 3913 geni down-regolati. Per il genotipo Lucariello invece sono stati identificati 2015 geni up-regolati e 2671 geni down-regolati. A livello qualitativo è riscontrabile che l'analisi effettuata utilizzando per il mappaggio i genomi specifici evidenzia circa 1000 DEG in meno in entrambi i genotipi e quindi probabilmente questi rappresentano dei falsi positivi. Inoltre circa 1000 geni DEG, ignorati nel mappaggio su Heinz, sono risultati essere regolati dallo stress idrico. Tale risultato conferma una maggiore precisione e specificità dei risultati ottenuti utilizzando come riferimento per il mappaggio il genoma specifico delle varietà.

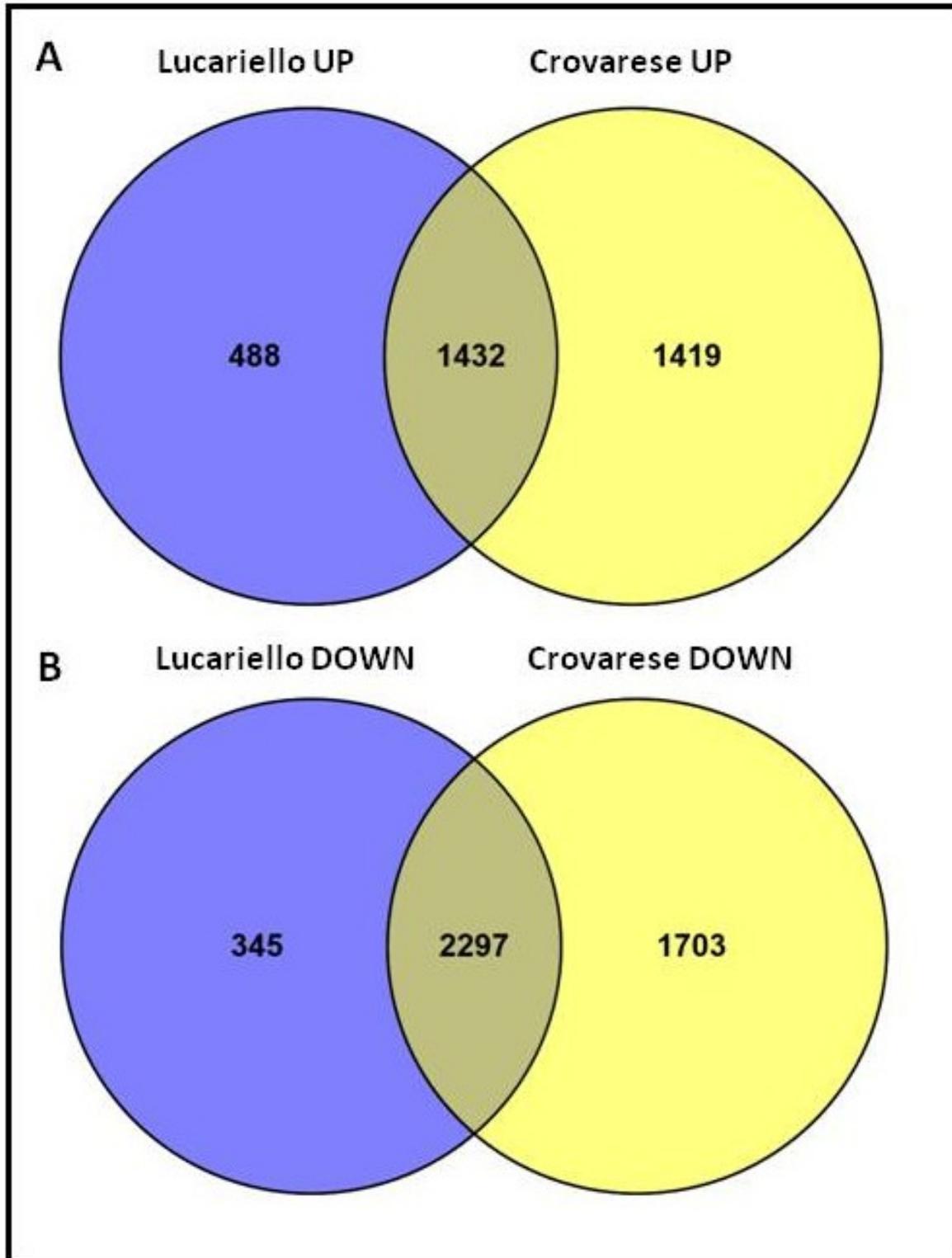


Figura 17: Diagramma di Venn dei geni differenzialmente espressi up-regolati (A), e down-regolati (B) tra i genotipi Lucariello (blue) e Crovarese (giallo), utilizzando il genoma di Heinz come riferimento per il mappaggio.

Per quanto riguarda i geni identificati non ci sono differenze significative nei valori di espressione tra i due mappaggi. Utilizzando i genomi specifici inoltre è stato possibile identificare una serie di geni “nuovi” denominati COR e LUC che identificano per lo più geni non annotati nel genoma del genotipo Heinz che sono stati identificati grazie al progetto di ri-sequenziamento dei genomi degli ecotipi campani. Nelle Tab. 11 e 12 sono riportati gli elenchi dei 20 DEG, ottenuti dal mappaggio effettuato utilizzando come riferimento i genomi specifici dei due ecotipi, maggiormente up-regolati e down-regolati ottenuti mediante l’esperienza di RNA-seq. Nelle liste di geni differenzialmente espressi per entrambi i genotipi sono stati individuati geni notoriamente coinvolti nella risposta allo stress idrico; in particolare per entrambi i genotipi sono identificati geni per la protezione delle strutture cellulari come le Universal Stress Protein, proteine LEA e HSP70; geni per l’organizzazione dell’acqua intracellulare come la acquaporine; fattori di trascrizione (Solyc04g005660, Solyc01g109690, Solyc12g010800) e geni coinvolti nella regolazione degli ormoni vegetali (Solyc03g006360, Solyc01g110570.2, Solyc11g072310.1, Solyc03g093610.1).

Tabella 11: Elenco dei 20 geni del genotipo Crovarese la cui espressione è maggiormente regolata (up e down) dallo stress idrico prolungato.

| Gene ID | Fc | Descrizione |
|----------------|-----------|---|
| Solyc01g057000 | 14,26 | <i>Universal stress protein family</i> |
| COR05g4485 | 14,02 | <i>Xylem NAC domain 1</i> |
| Solyc06g060970 | 12,64 | <i>Expansin-like protein</i> |
| Solyc03g025810 | 12,54 | <i>Low-temperature-induced</i> |
| Solyc02g093890 | 12,08 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc03g019820 | 11,75 | <i>Aquaporin</i> |
| Solyc03g118050 | 11,73 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc09g097760 | 11,45 | <i>Glycine rich protein</i> |
| COR03g3171 | 11,12 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc09g015450 | 11,08 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc06g064650 | 11,07 | <i>11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase</i> |
| Solyc06g072130 | 11,03 | <i>Aquaporin</i> |
| Solyc06g075990 | 11,02 | <i>Glyoxalase</i> |
| COR07g5879 | 10,96 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc03g116390 | 10,87 | <i>Late embryogenesis abundant</i> |
| Solyc04g071780 | 10,60 | <i>Cytochrome P450</i> |
| Solyc08g077900 | 10,53 | <i>Expansin-like protein</i> |
| Solyc03g006360 | 10,53 | <i>Auxin-repressed protein</i> |
| Solyc10g079150 | 10,52 | <i>Nuclear transcription factor Y subunit A-1</i> |
| Solyc01g057000 | 14,26 | <i>Universal stress protein family</i> |
| Solyc10g005400 | -13,3 | <i>Inositol oxygenase</i> |
| COR09g7267 | -11,7 | <i>Zinc finger BED domain</i> |
| Solyc01g110570 | -11,3 | <i>Auxin-induced SAUR-like</i> |
| Solyc08g067940 | -10,3 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc10g008710 | -10,2 | <i>GDSL esterase/lipase</i> |
| Solyc01g079180 | -10,1 | <i>Pectinesterase</i> |
| COR12g9629 | -9,84 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc07g008240 | -9,69 | <i>Non-symbiotic hemoglobin</i> |
| Solyc12g006570 | -9,48 | <i>Germacrene-D synthase</i> |
| Solyc11g006250 | -9,23 | <i>GDSL esterase/lipase GDSL</i> |
| Solyc00g138060 | 9,22 | <i>2-oxoglutarate-dependent dioxyg</i> |
| COR01g845 | -9,12 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc06g035580 | -9,10 | <i>Choline dehydrogenase</i> |
| Solyc07g052180 | -8,89 | <i>Unknown Protein</i> |
| COR04g3588 | -8,81 | <i>Protein RADIALIS-like 6</i> |
| Solyc07g055950 | -8,79 | <i>Meiosis 5</i> |
| Solyc06g069730 | -8,74 | <i>Chlorophyll a-b binding protein</i> |
| COR05g4442 | -8,51 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc12g009650 | -8,43 | <i>Proline rich protein</i> |
| Solyc04g005660 | -8,32 | <i>Transcription factor style2</i> |

Tabella 12: Elenco dei 20 geni del genotipo Lucariello la cui espressione è maggiormente regolata (up e down) dallo stress idrico prolungato.

| Gene ID | Fc | Descrizione |
|----------------|-----------|--|
| Solyc08g077900 | 14,19 | <i>Expansin-like protein</i> |
| Solyc03g118050 | 11,34 | <i>Unknown Protein</i> |
| LUC05g4943 | 11,08 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc07g007710 | 10,64 | <i>Defensin protein</i> |
| Solyc11g072310 | 10,64 | <i>Gibberellin 20-oxidase-3</i> |
| Solyc10g078770 | 10,61 | <i>SMP LEA 4</i> |
| LUC01g483 | 10,45 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc08g067500 | 10,42 | <i>Non-specificlipid-transfe</i> |
| Solyc01g014100 | 10,06 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc03g112590 | 9,99 | <i>Cell division protease</i> |
| Solyc06g060840 | 9,95 | <i>Oleasin</i> |
| Solyc01g057000 | 9,84 | <i>Universal stress protein</i> |
| LUC05g4458 | 9,68 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc01g102960 | 9,64 | <i>Class IV heat shock</i> |
| Solyc02g093180 | 9,63 | <i>Hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase</i> |
| Solyc06g060970 | 9,40 | <i>Expansin-like protein</i> |
| Solyc02g093890 | 9,37 | <i>Unknown Protein</i> |
| LUC09g7969 | 9,34 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc05g049860 | 9,24 | <i>Two-component-response regulator</i> |
| Solyc03g019820 | 9,19 | <i>Expansin-like protein</i> |
| Solyc01g109690 | -11,9 | <i>Myb family tf</i> |
| Solyc10g005400 | -10,9 | <i>Inositol oxygenase</i> |
| Solyc01g110570 | -10,3 | <i>Auxin-induced SAUR-</i> |
| LUC01g264 | -10,0 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc04g005660 | -9,54 | <i>Transcription factor style</i> |
| Solyc03g034400 | -9,23 | <i>Multidrug resistance prot</i> |
| Solyc12g011030 | -9,22 | <i>Xyloglucan endoglucosylase/hydrolas</i> |
| Solyc07g062710 | -9,07 | <i>BZIP transcription factor</i> |
| Solyc03g093610 | -8,98 | <i>Ethylene responsive transcription factor 1b</i> |
| Solyc01g079180 | -8,92 | <i>Pectinesterase</i> |
| Solyc05g005870 | -8,68 | <i>Nodulin MtN21 family</i> |
| Solyc12g010800 | -8,67 | <i>BZIP transcription factor</i> |
| Solyc01g109500 | -8,58 | <i>BURP domain-contain</i> |
| Solyc06g069730 | -8,50 | <i>Chlorophyll a-b binding</i> |
| Solyc09g090680 | -7,98 | <i>Cysteine-richrepeat secretory</i> |
| Solyc12g009650 | -7,94 | <i>Proline rich protein</i> |
| Solyc10g008440 | -7,79 | <i>Expansin B1</i> |
| Solyc02g070180 | -7,59 | <i>FAD-binding domain</i> |
| Solyc07g052210 | -7,55 | <i>Unknown Protein</i> |
| Solyc04g081790 | -7,53 | <i>GDSL esterase/lipase</i> |

3.1.3.c Validazione dei risultati di RNA-seq

Per validare i risultati ottenuti attraverso l'analisi RNA-seq, 13 geni differenzialmente espressi (Tab. 13), sono stati selezionati per un'ulteriore indagine mediante Real-Time PCR, allo scopo di valutarne l'espressione genica anche attraverso una seconda metodica analitica.

Tabella 13: Lista dei geni selezionati per la validazione dei risultati mediante qRT-PCR e relativo Fold Change ottenuto nell'analisi di RNA-seq.

| Genes | RNA-seq | | Description |
|----------------|--------------|---------------|--|
| | Fc Crovarese | Fc Lucariello | |
| Solyc03g007230 | 5,52 | 5,13 | <i>Protein phosphatase 2C</i> |
| Solyc04g078840 | 4,50 | 3,42 | <i>BZIP transcription factor</i> |
| Solyc03g117800 | 3,38 | 3,29 | <i>CER1 protein</i> |
| Solyc03g116100 | 2,87 | 2,55 | <i>MYB transcription factor</i> |
| Solyc01g079180 | -10,16 | -8,92 | <i>Pectinesterase</i> |
| Solyc03g013340 | -4,10 | -5,12 | <i>Aquaporin Z transmembrane water channel</i> |
| Solyc05g014000 | -8,23 | -7,45 | <i>Pectate lyase</i> |
| Solyc05g041200 | 2,40 | 2,09 | <i>Fitoene desaturase</i> |
| Solyc09g007270 | 3,40 | 4,19 | <i>Ascorbato peroxidase</i> |
| Solyc09g075460 | -1,84 | -2,25 | <i>Polygalacturonase</i> |
| Solyc02g085150 | 2,09 | 3,05 | <i>LEA-4</i> |
| Solyc03g007310 | -1,98 | -2,00 | <i>ABA receptor-PYL8</i> |
| Solyc07g063600 | -4,88 | -5,11 | <i>Chlorophyll binding protein</i> |

I geni selezionati presentano tutte funzioni importanti per la risposta allo stress idrico e codificano per: una protein phosphate 2C, un fattore di trascrizione bzip, un fattore di trascrizione Myb, la proteina CER1, una pectinesterasi, un'acquaporina Z, una pectato lyasi, la proteina 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, l'ascorbato perossidasi, una poligalatturonasi, una proteina LEA-4, il recettore dell'ABA pyl-8 e una proteina clorofilla-binding. La analisi qRT-PCR hanno confermato i dati di espressione ottenuti mediante analisi RNA-seq per tutti i geni analizzati (Fig. 18).

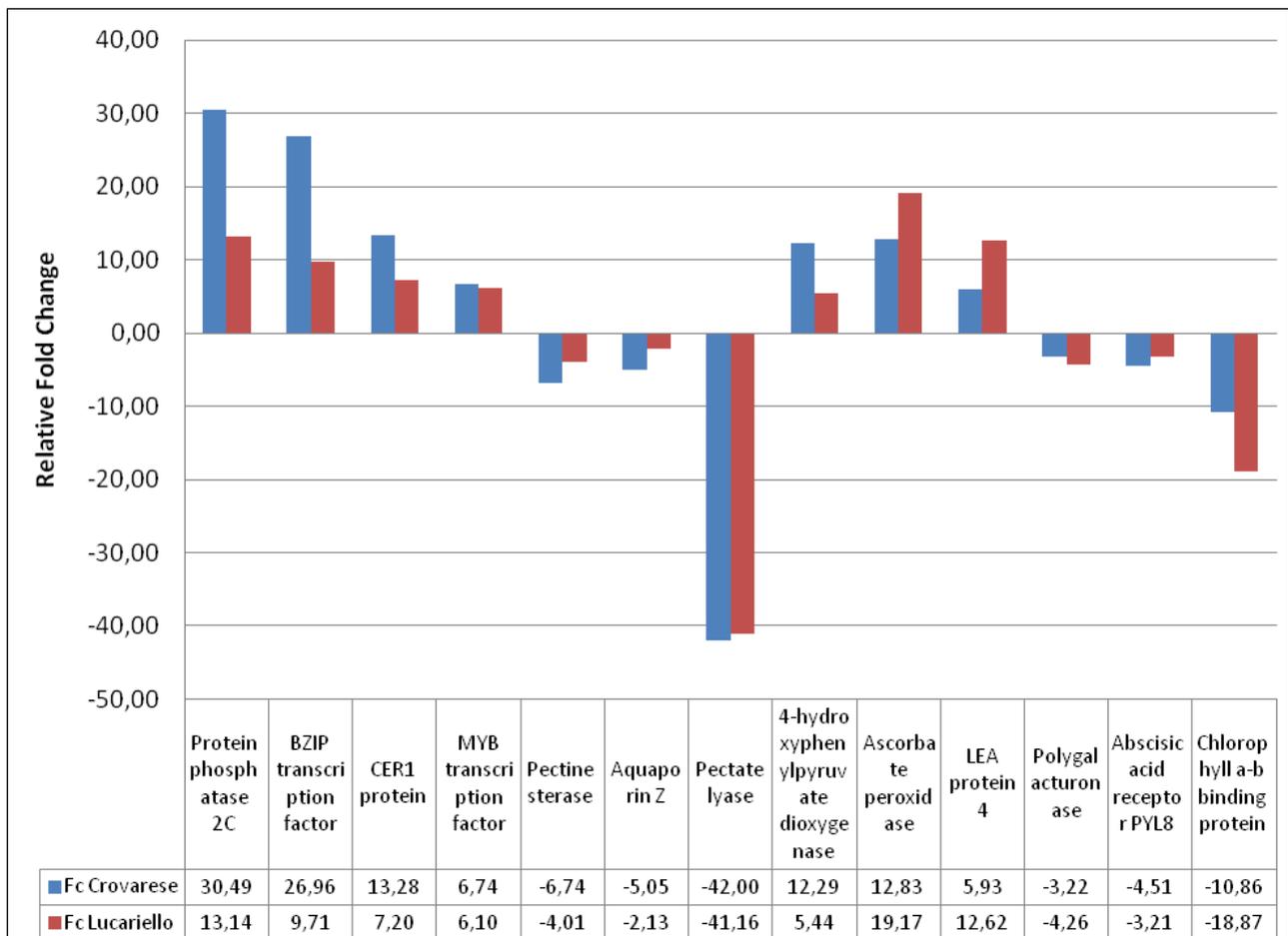


Figura 18: Validazione dei dati di espressione RNA-seq mediante qRT-PCR. Per ogni gene (tab. 13), i livelli di mRNA sono calcolati come Fold Change relativo rispetto i livelli di espressione per lo stesso gene del calibratore (campione controllo allo stesso punto sperimentale).

3.1.3.d Analisi di arricchimento Gene Ontology

Allo scopo di individuare i processi biologici interessati nella risposta allo stress idrico, i *dataset* di geni differenzialmente espressi, ottenuti per entrambi i genotipi sono stati utilizzati per un'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO). A tal fine sono stati selezionati DEG up-regolati e down-regolati con fold change >2 e <-2 , rispettivamente. Successivamente è stato utilizzato il software disponibile *online* sul sito AgriGO e sono state selezionate le categorie che presentavano almeno 5 geni e $FDR > 0,05$. L'analisi di arricchimento GO è stata effettuata per i *dataset* provenienti da tutti i mappaggi effettuati (dato non mostrato). Essendo i due genotipi entrambi

tolleranti ed entrambi adattati alle condizioni ambientali della stessa area geografica, i DEG comuni sono stati utilizzati per un'analisi di arricchimento GO comune al fine di identificare i processi biologici più importanti di risposta allo stress ed indicativi dei risultati di tutte le analisi GO.

Come mostrato in Fig. 19A-B l'analisi di arricchimento GO ha chiaramente indicato che tra le categorie dei geni up-regolati sono presenti quelle relative ai processi di risposta allo stress e alla privazione d'acqua ("*response to water*", "*response to stress*") che includono geni codificanti per proteine come le LEA, USP e HSP70 coinvolti nella protezione delle strutture cellulari. Inoltre è presente la categoria "*oxidoreductase activity*" che include geni importanti per rispondere allo stress ossidativo dovuto all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nelle GO relative i geni down-regolati sono presenti categorie di processi che tendono a ridurre la loro attività in presenza dello stress come: la fotosintesi che tende a essere fortemente limitata in presenza dello stress idrico; l'organizzazione della parete cellulare e della membrana citoplasmatica con l'inibizione della degradazione delle pectine nella lamella mediana e con una migliore organizzazione delle acquaporine di membrana.

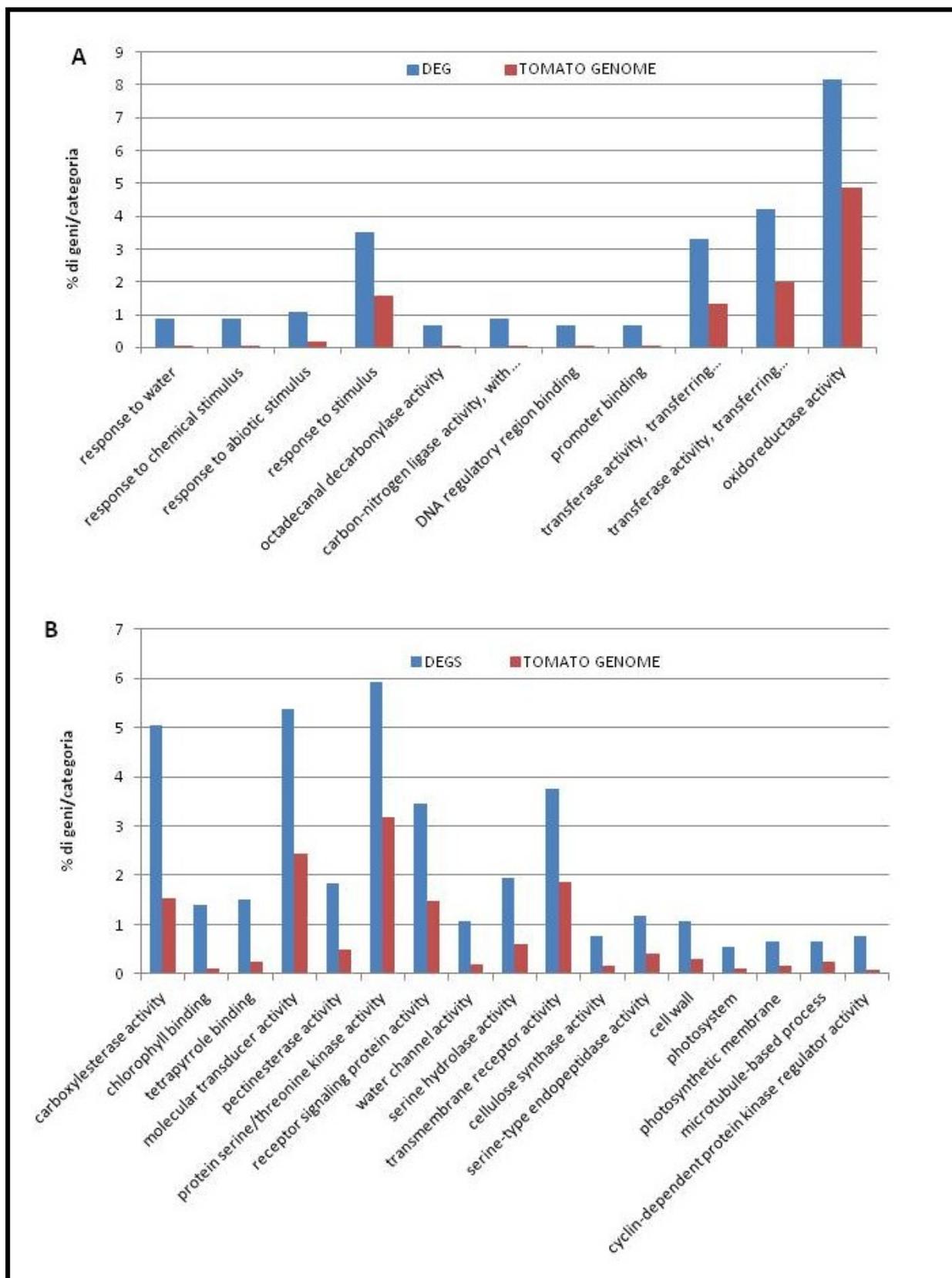


Figura 19: Analisi di arricchimento GO dei geni up-regolati (A) e down-regolati (B) comuni ad entrambi i genotipi ottenuti attraverso analisi RNA-seq. In blu la percentuale di DEGs per ogni categoria corrispondente presenti nei dataset ottenuti mediante RNA-seq; In rosso la percentuale di geni per ogni categoria corrispondente presenti nel genoma di pomodoro.

3.1.3.e Analisi dei pathway metabolici coinvolti nella risposta a stress

Per una caratterizzazione più precisa dei risultati dell'analisi del trascrittoma e per identificare alcuni dei principali *pathway* metabolici coinvolti nella risposta allo stress idrico, il *dataset* di geni differenzialmente espressi è stato utilizzato per un'analisi mediante il *software* Mapman v.3.06 (Thimm *et al.*, 2004). Questo *software* permette di raggruppare e visualizzare i DEG appartenenti a specifici *pathway* di interesse. Per un'analisi preliminare sono stati selezionati i *pathway* metabolici relativi alla fotosintesi, lo sviluppo e accrescimento della pianta e la parete cellulare.

Fotosintesi

Al fine di correlare i risultati della caratterizzazione fisiologica in termini di attività fotosintetica e conduttanza stomatica e le variazioni di espressione genica risultanti dall'analisi RNA-seq, il *software* MAPMAN è stato utilizzato per una visione d'insieme dei geni coinvolti nei *pathway* metabolici correlati alla fotosintesi.

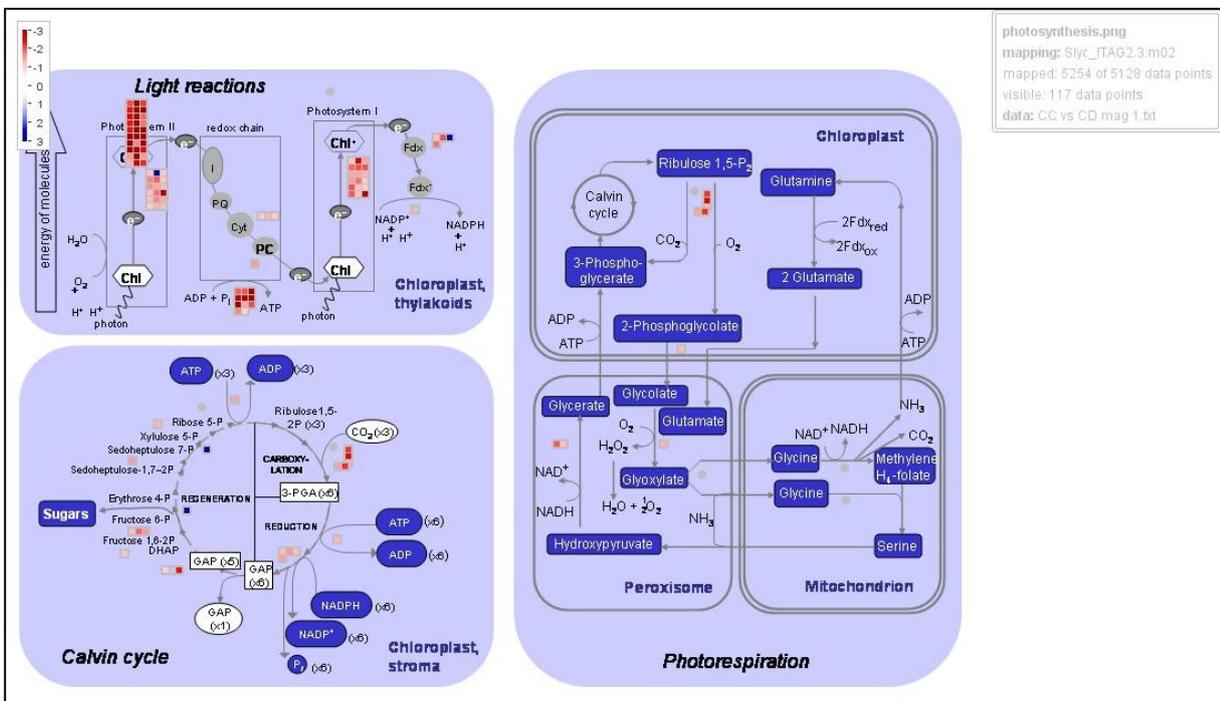


Figura 20: Analisi dell'espressione dei geni correlati alla fotosintesi mediante l'uso del software MAPMAN versione 3.06.

Come mostrato in Tab. 14 sono stati identificati 68 geni down-regolati relativi alla fotosintesi e in particolare ai processi della fase luminosa della fotosintesi come il sistema di legame della clorofilla, il fotosistema II, l'ATPase redox chain e il fotosistema II. Inoltre come mostrato in Fig. 20 anche i geni relativi il ciclo di Calvin (ad esempio la ribuloso bifosfato carbossilasi-solyc02g063150; la fruttosio 1-6 bisfosfatasi-solyc10g086730; la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi-solyc12g094640 e altri) e la foto respirazione (ad esempio la fosfoglicolato fosfatasi-solyc11g008620; la rubisco attivasi-solyc10g086580 e altri) sono tutti down-regolati confermando i risultati delle analisi fisiologiche sulle piante allo stadio S1 (13 giorni in assenza di irrigazione) e i risultati dell'analisi di arricchimento GO.

Tabella 14: Lista dei DEG risultante dall'analisi RNA-seq codificanti per proteine coinvolte nella fasi luminosa della fotosintesi identificati utilizzando il software MAPMAN.

| Geni | Fc Crow | Fc Luc | Descrizione |
|----------------|---------|--------|---|
| Solyc10g006230 | -2,022 | -2,194 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 7 chloroplastic</i> |
| Solyc02g070980 | -6,548 | -7,319 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc12g011450 | -2,158 | -2,425 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 13 chloroplastic</i> |
| Solyc01g105050 | NDE | -2,831 | <i>Chlorophyll a-b binding protein</i> |
| Solyc07g063600 | -4,879 | -5,108 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 13 chloroplastic</i> |
| Solyc08g067320 | -4,631 | -4,950 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc05g056050 | -2,549 | -2,608 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 6A chloroplastic</i> |
| Solyc06g069730 | -8,736 | -8,501 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 4 chloroplastic</i> |
| Solyc01g105030 | -2,173 | -2,784 | <i>Chlorophyll a-b binding protein chloroplastic</i> |
| Solyc03g005790 | NDE | -4,979 | <i>Chlorophyll a/b-binding protein</i> |
| Solyc02g070970 | -5,471 | -5,832 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc09g014520 | -1,794 | -2,127 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 6A chloroplastic</i> |
| Solyc02g071000 | -5,397 | -5,751 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc02g070940 | -4,826 | -4,556 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc03g005770 | -3,852 | -4,498 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 3C-like</i> |
| Solyc03g005780 | -6,181 | -6,991 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 3C-like</i> |
| Solyc02g071010 | -3,167 | -3,180 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc02g070950 | -6,572 | -6,896 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc03g005760 | -1,674 | -2,056 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 3C-like</i> |
| Solyc12g006140 | -3,000 | -3,816 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 3C chloroplastic</i> |
| Solyc02g070990 | -4,832 | -5,500 | <i>Chlorophyll a/b binding protein</i> |
| Solyc07g047850 | -3,812 | -4,135 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 4 chloroplastic</i> |
| Solyc03g115900 | -2,405 | -2,726 | <i>Chlorophyll a-b binding protein P4 chloroplastic</i> |
| Solyc12g009200 | -1,525 | -1,883 | <i>Chlorophyll a-b binding protein chloroplastic</i> |

| | | | |
|----------------|--------|--------|---|
| Solyc08g067330 | NDE | -5,090 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 3C-like</i> |
| Solyc10g007690 | -1,505 | -1,584 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 8 chloroplastic</i> |
| Solyc07g022900 | -1,318 | -1,388 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 4 chloroplastic</i> |
| Solyc06g063370 | -2,638 | -3,036 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 1A chloroplastic</i> |
| Solyc12g011280 | -2,264 | -2,738 | <i>Chlorophyll a-b binding protein 8 chloroplastic</i> |
| Solyc02g079950 | -1,145 | -1,826 | <i>Oxygen-evolving enhancer protein 3</i> |
| Solyc02g065400 | -1,072 | -1,556 | <i>Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II</i> |
| Solyc07g044860 | -1,661 | -1,793 | <i>Oxygen-evolving enhancer protein 2 chloroplastic</i> |
| Solyc12g094720 | -1,953 | -1,879 | <i>PsbP domain-containing protein 3 chloroplastic</i> |
| Solyc09g065910 | -1,263 | -1,518 | <i>Photosystem II reaction center W protein</i> |
| Solyc10g077120 | -1,565 | -1,476 | <i>Photosystem II core complex proteins psbY</i> |
| Solyc05g007780 | -1,285 | -0,948 | <i>Oxygen evolving enhancer protein 3</i> |
| Solyc11g008480 | -1,322 | -1,287 | <i>Photosystem II oxygen evolving complex protein PsbP</i> |
| Solyc09g064500 | -1,186 | -1,533 | <i>Photosystem II reaction center psb28 protein</i> |
| Solyc06g084050 | -1,795 | -2,365 | <i>Photosystem II reaction center W protein</i> |
| Solyc10g006530 | -2,934 | -1,340 | <i>Oxygen evolving enhancer 3 family protein</i> |
| Solyc09g011010 | -1,205 | -1,233 | <i>One helix protein</i> |
| Solyc07g055050 | -1,944 | -1,545 | <i>ATP synthase I-like protein</i> |
| Solyc10g044540 | -2,869 | -2,897 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc04g071300 | -3,254 | -3,625 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc06g072540 | -2,847 | -4,575 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc02g012010 | NDE | -2,952 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc02g012000 | -3,823 | -4,476 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc11g051170 | -3,295 | -3,427 | <i>ATP synthase subunit alpha chloroplastic</i> |
| Solyc02g080540 | -1,513 | -1,529 | <i>ATP synthase gamma chain</i> |
| Solyc12g056830 | -1,672 | -1,215 | <i>ATP synthase delta subunit</i> |
| Solyc05g050500 | -1,008 | NDE | <i>ATP synthase F1 delta subunit</i> |
| Solyc06g082940 | -1,134 | -1,485 | <i>Photosystem I reaction center subunit XI</i> |
| Solyc08g013670 | -2,637 | -3,316 | <i>Photosystem I reaction center subunit</i> |
| Solyc06g054260 | -1,414 | -1,479 | <i>Photosystem I reaction center subunit II</i> |
| Solyc07g066150 | -1,868 | -1,782 | <i>Photosystem I reaction center subunit V</i> |
| Solyc06g074200 | -2,019 | -3,174 | <i>Sex-linked protein 9</i> |
| Solyc06g083680 | -2,014 | -1,509 | <i>Photosystem I reaction center subunit IV A</i> |
| Solyc02g036320 | NDE | -2,239 | <i>Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein</i> |
| Solyc03g120640 | -1,405 | -1,530 | <i>Photosystem I reaction center subunit VI-1 chloroplastic</i> |
| Solyc10g005050 | -1,273 | -1,673 | <i>Thylakoid membrane phosphoprotein 14 kDa</i> |
| Solyc06g066640 | -1,468 | -2,554 | <i>Photosystem I reaction center subunit VI-1 chloroplastic</i> |
| Solyc08g006930 | -1,785 | -2,278 | <i>Photosystem I reaction center subunit X psaK</i> |
| Solyc12g033060 | NDE | -1,669 | <i>Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2</i> |
| Solyc02g069450 | -1,528 | -1,715 | <i>Photosystem I reaction center subunit III</i> |
| Solyc01g017320 | NDE | -1,499 | <i>Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1</i> |
| Solyc09g063130 | -1,171 | -1,437 | <i>Photosystem I reaction center subunit IV A</i> |
| Solyc01g007540 | -1,123 | -1,584 | <i>Cytochrome b6-f complex subunit 4</i> |
| Solyc01g007530 | NDE | -1,244 | <i>photosynthetic electron transfer B</i> |

Infine allo scopo di investigare la degenerazione dell'apparato fotosintetico nei genotipi indeterminati utilizzati per l'esperimento di RNA-seq e confrontare la situazione nel genotipo Red Setter, il gene Solyc03g112590 (*Cell division protease ftsH homolog*) è stato selezionato per analisi di Real Time PCR. Recentemente questo gene è stato infatti identificato come utile alle piante sottoposte a stress idrico per la protezione e il riparo del fotosistema II, e conseguentemente up-regolato in condizioni di carenza d'acqua (Zhang *et al.*, 2014). I risultati dell'analisi RNA-seq hanno mostrato per questo gene valori di espressione incrementati di 7,69 e 9,98 volte nelle piante *drought* rispettivamente per i genotipi Crovarese e Lucariello.

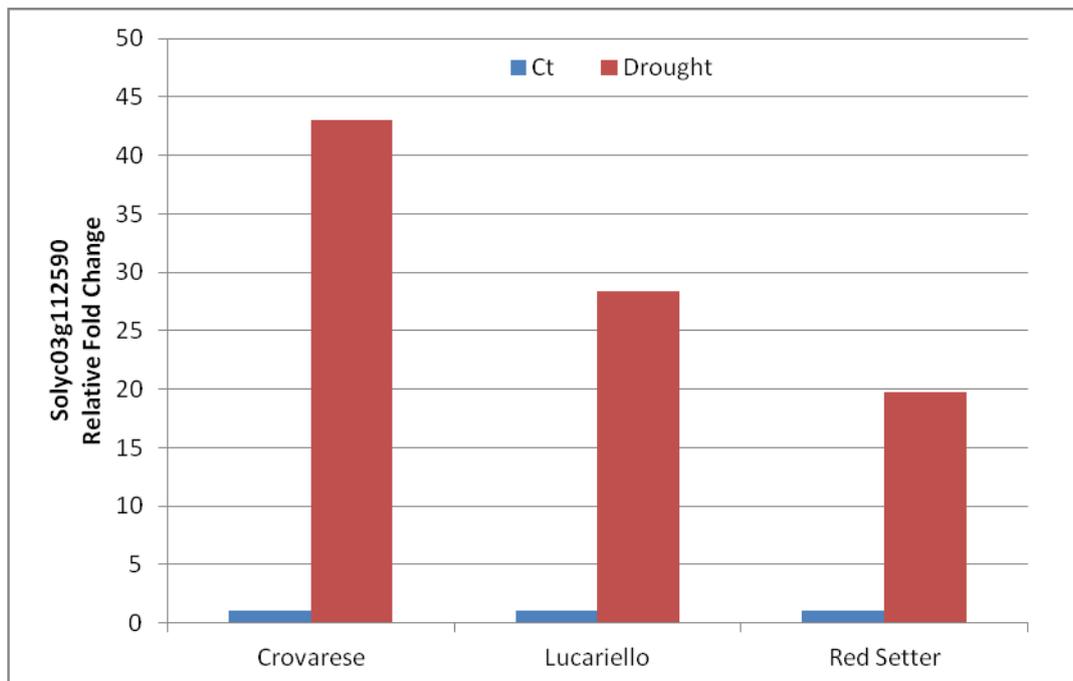


Figura 21: Espressione del gene Solyc03g112590 in piante di pomodoro, dei genotipi indicati, allevate in serra per 13 giorni in assenza di irrigazione (Stadio S1) misurata attraverso qRT-PCR. I livelli di espressione relativa dei campioni stressati (rosso) sono stati determinati rispetto quelli dei campioni controllo (blu).

Come chiaramente indicato in Fig. 21, i risultati di qRT-PCR confermano i risultati dell'analisi RNA-seq e l'up-regolazione del gene di protezione del fotosistema II. Inoltre i valori d'espressione del genotipo determinato e suscettibile alla *drought* (Red Setter) appaiono inferiori a quelli dei genotipi indeterminati.

Sviluppo e Accrescimento della pianta

Al fine di valutare le modificazioni a livello trascrittomico implicate nell'accrescimento in condizioni di stress idrico è stato utilizzato il software MAPMAN con particolare attenzione ai pathway metabolici correlati: sintesi e catabolismo dell'auxina, il ciclo e la divisione cellulare. Come mostrato in Tab. 15 i risultati consentono l'identificazione di 73 geni differenzialmente espressi di cui 9 up-regolati e i restanti down-regolati.

Tabella 15: Lista dei DEG coinvolti nei processi relativi l'accrescimento identificati utilizzando il software MAPMAN.

| Geni | Fc Crovarese | Fc Lucariello | Description | Categorie |
|----------------|--------------|---------------|--|---------------|
| Solyc10g079640 | -1,379 | -0,894 | <i>laa-amino acid hydrolase 9</i> | Auxin related |
| Solyc05g006220 | -1,384 | NDE | <i>IAA-amino acid hydrolase</i> | |
| Solyc03g118740 | -2,605 | -1,802 | <i>Auxin efflux carrier</i> | |
| Solyc11g013310 | -2,166 | NDE | <i>Auxin transporter-like protein 3</i> | |
| Solyc05g008060 | -1,873 | -1,501 | <i>Auxin efflux carrier</i> | |
| Solyc10g080880 | -2,108 | -1,333 | <i>Auxin efflux carrier</i> | |
| Solyc04g007690 | -3,318 | -2,938 | <i>Auxin efflux carrier</i> | |
| Solyc02g079190 | -1,295 | -1,511 | <i>Auxin F-box protein 5</i> | |
| Solyc01g097390 | NDE | -1,706 | <i>Aldo/keto reductase family protein</i> | |
| Solyc06g053290 | -1,351 | -0,825 | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | |
| Solyc03g082510 | -2,255 | NDE | <i>Auxin-responsive family protein</i> | |
| Solyc05g056430 | -1,459 | NDE | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | |
| Solyc03g082520 | NDE | -2,136 | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | |
| Solyc10g083320 | -5,023 | -2,587 | <i>Auxin-induced SAUR-like protein</i> | |
| Solyc06g053260 | -1,908 | -0,928 | <i>Auxin-responsive family protein</i> | |
| Solyc01g110580 | -7,371 | -3,756 | <i>Auxin-induced SAUR-like protein</i> | |
| Solyc08g068490 | NDE | -1,925 | <i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i> | |
| Solyc06g082860 | -1,362 | -1,394 | <i>Dopamine beta-monoxygenase</i> | |
| Solyc09g097890 | -6,933 | -5,880 | <i>Membrane protein</i> | |
| Solyc11g011670 | -1,591 | NDE | <i>Auxin-responsive protein</i> | |
| Solyc01g097380 | -1,409 | NDE | <i>Aldo/keto reductase family protein</i> | |
| Solyc01g110560 | -1,786 | -2,372 | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | |
| Solyc07g054580 | -2,281 | -1,630 | <i>GH3 auxin-responsive promoter</i> | |
| Solyc10g006610 | -3,259 | -2,899 | <i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3</i> | |
| Solyc12g009290 | -4,460 | NDE | <i>SAUR33-auxin-responsive SAUR family</i> | |
| Solyc03g033590 | -1,890 | NDE | <i>Auxin-induced SAUR-like protein</i> | |
| Solyc08g068480 | -2,738 | -1,718 | <i>Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8</i> | |
| Solyc07g009340 | -3,286 | NDE | <i>Ferric-chelate reductase 1</i> | |
| Solyc01g110570 | -11,317 | -10,313 | <i>Auxin-induced SAUR-like protein</i> | |
| Solyc07g048050 | -2,042 | NDE | <i>Dopamine beta-monoxygenase</i> | |
| Solyc09g019980 | -1,764 | -2,497 | <i>Ferric-chelate reductase 1</i> | |
| Solyc05g056440 | -1,792 | NDE | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | |

| | | | | |
|----------------|--------|--------|---|---------------|
| Solyc03g082520 | NDE | -2,136 | <i>Auxin responsive SAUR protein</i> | Cell Division |
| Solyc08g075920 | -3,188 | -2,999 | <i>Protein BREVIS RADIX</i> | |
| Solyc09g059440 | -2,356 | NDE | <i>CDC45 (Cell division cycle 45)-like protein</i> | |
| Solyc06g076860 | -1,716 | -1,508 | <i>Cell division control protein 6 homolog</i> | |
| Solyc02g087980 | -1,671 | -1,474 | <i>Structural maintenance of chromosomes</i> | |
| Solyc05g051510 | -1,471 | NDE | <i>Prohibitin</i> | |
| Solyc03g007980 | -1,053 | -0,766 | <i>Septum site-determining protein MinD</i> | |
| Solyc10g007680 | 1,215 | 1,513 | <i>Regulator of chromosome condensation RCC1</i> | |
| Solyc06g074980 | 1,249 | 0,969 | <i>26S protease regulatory subunit 6B homolog</i> | |
| Solyc04g076300 | 1,297 | NDE | <i>Transporter conductance ion channel</i> | |
| Solyc05g007280 | 1,388 | NDE | <i>Protein Brevis radix-like 1</i> | Cell Cycle |
| Solyc05g006940 | 1,593 | 0,946 | <i>Regulator of chromosome condensation</i> | |
| Solyc03g112590 | 7,687 | 9,989 | <i>Cell division protease ftsH homolog</i> | |
| Solyc01g089850 | -5,605 | -2,945 | <i>Cyclin-dependent protein kinase regulator</i> | |
| Solyc01g090800 | -5,220 | NDE | <i>Cyclin-dependent kinase</i> | |
| Solyc02g079370 | -4,047 | -3,066 | <i>Cyclin-D6-1</i> | |
| Solyc01g107730 | -3,660 | NDE | <i>Cyclin</i> | |
| Solyc04g078310 | -3,289 | NDE | <i>Cyclin A-like protein</i> | |
| Solyc10g078330 | -3,362 | NDE | <i>Cyclin B-like protein</i> | |
| Solyc01g009040 | -3,200 | NDE | <i>Cyclin B1</i> | |
| Solyc04g078470 | -2,967 | -2,629 | <i>Cyclin D3-1</i> | |
| Solyc03g032190 | -2,919 | NDE | <i>Cyclin B2</i> | |
| Solyc04g082430 | -2,802 | NDE | <i>B-like cyclin</i> | |
| Solyc06g043150 | -2,560 | NDE | <i>WD-repeat cell cycle regulatory protein</i> | |
| Solyc03g093790 | -2,606 | -2,622 | <i>Cyclin-like</i> | |
| Solyc06g065680 | -2,572 | -3,150 | <i>Cyclin-dependent protein kinase regulator</i> | |
| Solyc10g054910 | -2,735 | -1,878 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> | |
| Solyc10g080950 | -2,049 | NDE | <i>Cyclin B-like protein</i> | |
| Solyc03g119860 | -1,995 | -1,665 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> | |
| Solyc10g080400 | -2,099 | NDE | <i>Polychome UV-B-insensitive</i> | |
| Solyc09g061280 | -1,901 | NDE | <i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i> | |
| Solyc12g088520 | -1,888 | NDE | <i>Cyclin A-like protein</i> | |
| Solyc12g088650 | -1,476 | -1,546 | <i>Cyclin D</i> | |
| Solyc01g110530 | -1,352 | -0,881 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i> | |
| Solyc03g006670 | -1,132 | NDE | <i>Cyclin D1</i> | |
| Solyc12g013580 | -0,985 | -1,222 | <i>Peptidyl-prolyl cis isomerase cyclophilin-type</i> | |
| Solyc02g090480 | -0,969 | -1,342 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D</i> | |
| Solyc06g076970 | 1,042 | 0,971 | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> | |
| Solyc03g113860 | 1,033 | 1,245 | <i>Ribosomal RNA methyltransferase G</i> | |
| Solyc12g098310 | 1,587 | 1,303 | <i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i> | |

I geni relativi al metabolismo delle auxine risultano tutti down-regolati confermando che i processi relativi l'accrescimento correlati a questo fitoregolatore vegetale sono drasticamente inibiti in condizioni di siccità. Anche i processi di divisione cellulare e la

regolazione del ciclo cellulare risultano inibiti significativamente. La down-regolazione di tutti questi geni concorda con la riduzione del *Leaf area index* evidenziata nei genotipi Crovarese e Lucariello sottoposti a stress idrico (Fig. 11).

Parete cellulare

Per analizzare il ruolo della parete cellulare nella risposta allo stress idrico, sono stati analizzati i risultati del trascrittoma mediante il software MAPMAN. Sono stati identificati 134 DEG relativi la parete cellulare (dato non mostrato). Tra questi sono stati identificati 41 geni relativi la degradazione della parete cellulare quali cellulasi ed endoglucanasi, mannan-xylos-arabino-fucosio, pectato lyasi e poligalatturonasi. Inoltre sono stati identificati 39 geni relativi alla modificazione della parete cellulare (ad esempio pectinesterasi o espansine). L'87% di questi 80 geni totali risulta negativamente regolato a seguito della privazione d'acqua, evidenziando la necessità di mantenere la parete cellulare compatta al fine di evitare la perdita d'acqua.

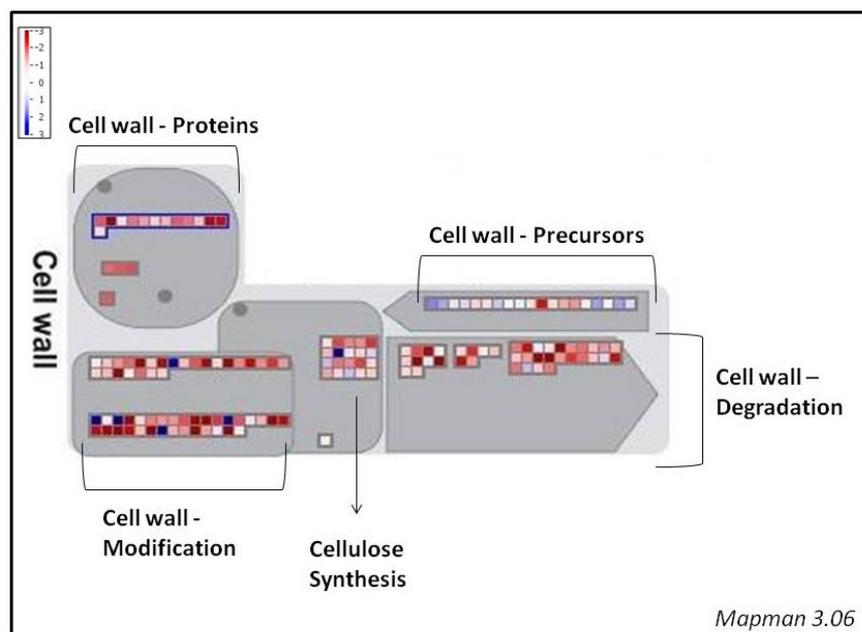


Figura 22: Analisi dei geni correlati la parete cellulare mediante il software MAPMAN versione 3.06.

In particolare all'interno del *dataset* dei geni down-regolati la famiglia genica delle pectinasi, un gruppo di proteine in grado di depolimerizzare la pectina, appare particolarmente rappresentata. Come mostrato in Tab. 16 sono stati identificati 42 geni down-regolati appartenenti a 4 famiglie differenti: pectinesterasi, pectin acetyl-transferasi, pectato liasi e polygalatturonasi. La ridotta espressione di questi geni inibisce la degradazione della parete cellulare nella lamella mediana. Al fine di investigare il ruolo di questa famiglia proteica, 3 geni differenzialmente espressi (Solyc01g079180, Solyc05g014000, Solyc09g075460) sono stati selezionati per un'analisi mediante Real-time PCR per un approfondimento dei profili di espressione durante le diverse fasi del ciclo stress-recupero-stress nei genotipi Crovarese e Lucariello e sul genotipo determinato Red Setter (SR43).

Come mostrato in Fig. 23, le analisi di qRT-PCR confermano per quanto riguarda la fase S1, i risultati già riscontrati per le analisi di RNA-seq. Inoltre anche il genotipo Red Setter mostra un'evidente de-regolazione dei geni analizzati ma a livelli inferiori rispetto quelli dei genotipi ad accrescimento indeterminato. Durante la fase sperimentale RW i 3 geni analizzati nei genotipi indeterminati, risultano up regolati nelle piante *drought* rispetto quelle controllo. Al contrario nel genotipo Red Setter, i geni codificanti pectinesterasi e poligalatturonasi non risultano differenzialmente espressi mentre il gene relativo la pectato liasi risulta up regolato in condizioni di *drought*. Infine durante la fase S2 i geni risultano come in fase S1 down-regolati nei genotipi Crovarese e Lucariello mentre non sono regolati dallo stress idrico nel genotipo Red Setter.

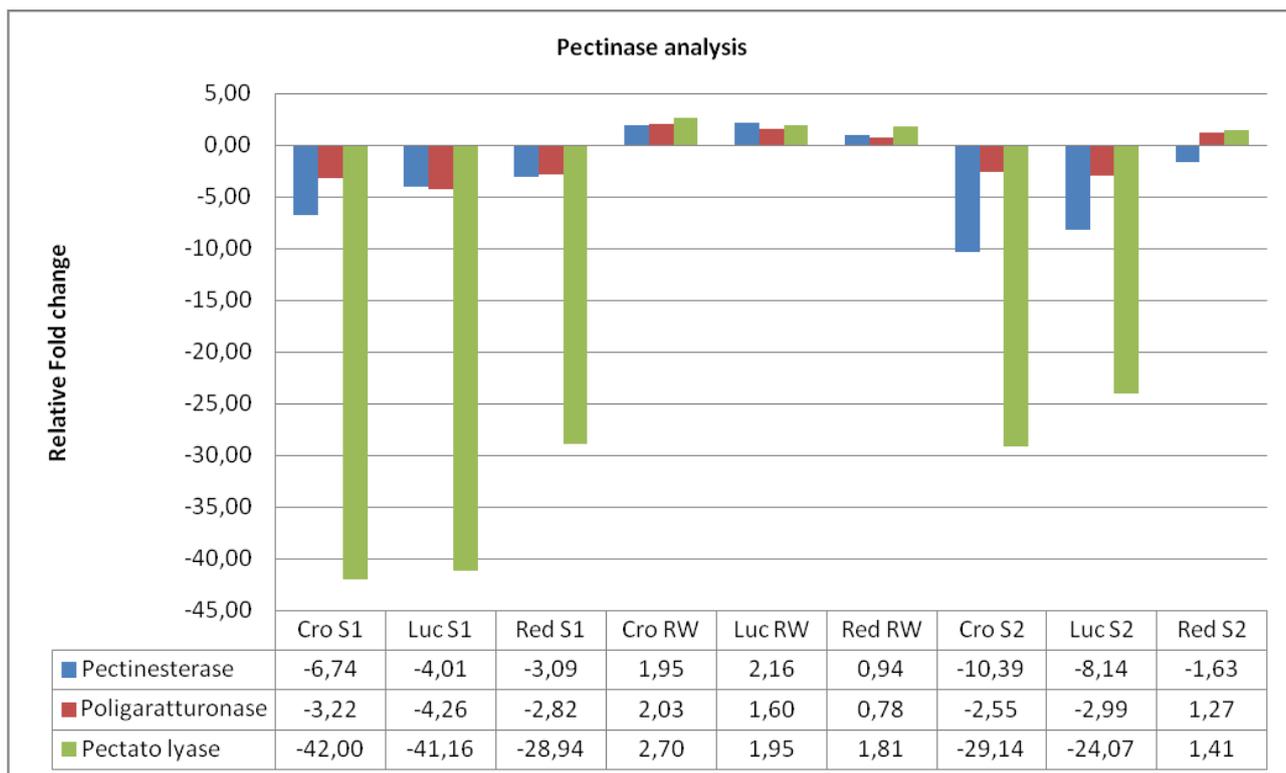


Figura 23: Studio dell'espressione dei geni Solyc01g079180 (blu), Solyc05g014000 (verde) e Solyc09g075460 (rosso) in foglie di piante di pomodoro prelevate dai genotipi Crovarese (Cro), Lucariello (Luc) e Red Setter (Red) mediante analisi qRT-PCR. Per ogni gene, i livelli di mRNA sono calcolati come Fold Change relativo rispetto i livelli di espressione per lo stesso gene del calibratore (campione controllo allo stesso punto sperimentale). Le analisi sono state effettuate da campioni di foglie prelevati ai punti sperimentali S1, RW e S2.

Tabella 16: Lista dei geni differenzialmente espressi appartenenti alla famiglia delle pectinasi. I geni selezionati per l'analisi qRT-PCR sono evidenziati in grigio.

| Geni | Fc Crov | Fc Luc | Descrizione |
|-----------------------|--------------|--------------|---|
| Solyc05g014000 | -8,23 | -7,45 | <i>Pectato lyase</i> |
| Solyc03g111690 | -2,71 | -3,79 | |
| Solyc09g091430 | -6,73 | -5,65 | |
| Solyc09g061890 | -2,56 | -2,11 | |
| Solyc06g083580 | -2,07 | -2,53 | |
| Solyc11g008140 | -3,84 | -3,45 | |
| Solyc05g055510 | -1,76 | -2,15 | |
| Solyc09g008380 | -2,81 | NDE | |
| Solyc03g071570 | -2,39 | -2,95 | |
| Solyc01g102350 | -1,72 | -1,22 | <i>Pectin acetyl-transferase</i> |
| Solyc10g038130 | -1,68 | -1,32 | |
| Solyc08g005800 | -2,90 | -2,47 | |
| Solyc07g017600 | -2,61 | -2,00 | <i>Pectinesterase</i> |
| Solyc03g123620 | -2,81 | -3,53 | |
| Solyc06g051960 | -3,08 | -3,19 | |
| Solyc03g083360 | -2,32 | -2,60 | |

| | | | |
|----------------|--------|-------|--------------------------|
| Solyc01g091050 | -4,18 | -2,06 | |
| Solyc01g099960 | -1,05 | NDE | |
| Solyc02g080210 | NDE | -3,84 | |
| Solyc02g080220 | -4,02 | -4,14 | |
| Solyc09g075350 | -3,36 | -2,39 | |
| Solyc06g009190 | -1,62 | -1,34 | |
| Solyc11g019910 | -1,14 | -1,09 | |
| Solyc03g083730 | -3,15 | -4,23 | |
| Solyc03g083770 | -2,98 | -2,40 | |
| Solyc03g083720 | -1,70 | -2,24 | |
| Solyc05g047590 | -4,44 | -2,25 | |
| Solyc03g123630 | -1,10 | -1,34 | |
| Solyc07g042390 | -2,52 | -2,13 | |
| Solyc07g043240 | -2,53 | NDE | |
| Solyc08g006690 | -1,43 | NDE | |
| Solyc12g009270 | -5,37 | NDE | |
| Solyc01g079180 | -10,16 | -8,92 | |
| Solyc11g005820 | -4,44 | -3,77 | |
| Solyc03g083710 | -3,41 | NDE | |
| Solyc06g068040 | -2,82 | -1,39 | <i>Polygalacturonase</i> |
| Solyc03g116500 | -1,77 | -2,08 | |
| Solyc08g060970 | -2,79 | -1,33 | |
| Solyc09g014480 | -2,69 | NDE | |
| Solyc08g081480 | -1,93 | -1,30 | |
| Solyc09g075460 | -1,84 | -2,25 | |

3.1.3.f Analisi della famiglia genica LEA di *Solanum lycopersicum*

Molte sono le famiglie geniche note per il coinvolgimento nei meccanismi di risposta a stress osmotici e nei meccanismi di tolleranza a condizioni estreme di stress idrico. Tra le maggiormente studiate vi è la famiglia delle Proteine LEA, (*Late Embryogenesis Abundant*). Nonostante il ruolo di queste proteine sia ampiamente dimostrato, è ancora poco nota la loro attività. Al fine di analizzare la famiglia delle LEA di *Solanum lycopersicum* è stato utilizzato un approccio bioinformatico per l'identificazione di tutti i geni codificanti per proteine LEA in pomodoro. Le sequenze proteiche di tutti i geni LEA identificati sono state allineate tramite il *software* MUSCLE e sono stati identificati i vari domini funzionali delle diverse classi di proteine LEA

attraverso il *software* INTERPROT-SCAN. Successivamente è stato costruito un albero filogenetico preliminare, senza radice (*unrooted*), utilizzando il metodo della massima verosimiglianza (*maximum likelihood*).

Sulla base dei risultati delle clusterizzazioni delle sequenze nell'albero filogenetico e dell'analisi Interprot sono state identificate le varie sottofamiglie e i corrispondenti geni LEA all'interno di queste. Un certo numero di geni dopo l'analisi Interprot non ha mostrato di appartenere ad alcuna sottofamiglia e pertanto sono stati considerati inizialmente "*unknown*". Le varie sequenze delle proteine LEA raggruppate all'interno di ogni sottofamiglia sono state poi utilizzate per ottenere una sequenza consenso caratteristica di ogni sottofamiglia e queste sono state utilizzate per un'analisi BLAST P contro il genoma di pomodoro.

Le attività descritte hanno consentito di identificare 37 geni codificanti per proteine LEA in *Solanum lycopersicum*. L'analisi BLAST P ha inoltre permesso di identificare per alcuni dei geni "*unknown*" la sottofamiglia di appartenenza. Le 37 sequenze proteiche sono state poi utilizzate per ricostruire il definitivo albero filogenetico delle proteine LEA di pomodoro (Fig. 24). Infine i risultati delle clusterizzazioni identificati nell'albero sono stati incrociati con quelli dell'esperimento di RNA-seq per identificare i geni LEA differenzialmente espressi a seguito dello stress idrico (Tab. 17): 15 geni per il genotipo Crovarese e 14 per il genotipo Lucariello. Inoltre 3 geni sono risultati essere espressi nelle foglie dei due genotipi ma non in maniera differenziale in risposta a stress idrico (dato non mostrato). I restanti geni sono risultati non essere espressi in foglia nello specifico momento dello sviluppo. Come si può osservare in Fig. 24 e Tab. 17, le sottofamiglie che risultano particolarmente sovra-esprese in presenza di uno stress idrico sono le "*LEA 4*" e le "*deidrine*".

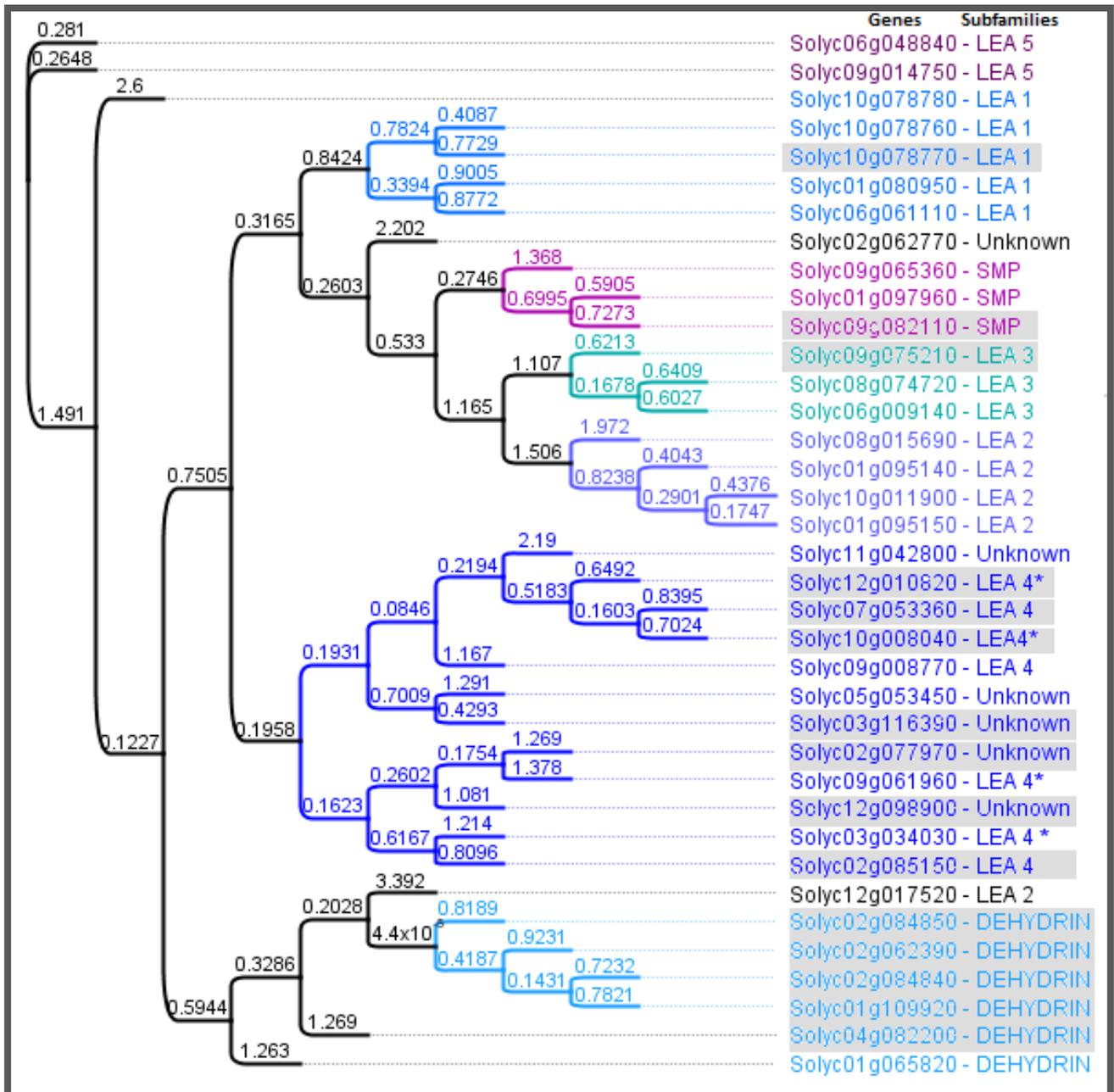


Figura 24: Albero filogenetico, senza radice, dei geni LEA di pomodoro. I riquadri grigi identificano i geni che risultano up-regolati in risposta a condizioni di stress idrico prolungato (S1). Gli * indicano quei geni inizialmente "unknown" a cui l'analisi BLAST P ha successivamente assegnato una sottofamiglia di appartenenza.

Tabella 17: Lista dei geni codificanti proteine LEA differenzialmente espressi a seguito dello stress idrico prolungato (S1). Sono riportati i Fold change di espressione dei genotipi Lucariello e Crovarese.

| Geni | Fc Crov | Fc Luc | Sotto-famiglia |
|----------------|----------------|---------------|-----------------------|
| Solyc03g116390 | 10,874 | 8,107 | <i>Unknown (LEA4)</i> |
| Solyc02g084850 | 10,123 | 8,624 | <i>Dehydrin</i> |
| Solyc02g077970 | 9,954 | 7,359 | <i>Unknown (LEA4)</i> |
| Solyc10g078770 | 8,903 | 10,612 | <i>LEA1</i> |
| Solyc12g098900 | 7,262 | 5,489 | <i>Unknown (LEA4)</i> |
| Solyc01g109920 | 7,111 | NDE | <i>Dehydrin</i> |
| Solyc07g053360 | 5,369 | 4,914 | <i>LEA4</i> |
| Solyc02g062390 | 4,764 | 6,020 | <i>Dehydrin</i> |
| Solyc02g084840 | 4,067 | 3,413 | <i>Dehydrin</i> |
| Solyc09g075210 | 3,239 | 1,651 | <i>LEA3</i> |
| Solyc12g010820 | 2,939 | 2,695 | <i>LEA4*</i> |
| Solyc10g008040 | 2,479 | 8,714 | <i>LEA4*</i> |
| Solyc04g082200 | 2,226 | 3,246 | <i>Dehydrin</i> |
| Solyc02g085150 | 2,090 | 3,053 | <i>LEA4</i> |
| Solyc09g082110 | 1,160 | 1,029 | <i>SMP</i> |

3.2 STUDIO DEL RUOLO DELL'ENZIMA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI IN RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO

Al fine di studiare il ruolo dell'enzima Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH) in risposta allo stress idrico in pomodoro sono stati condotti esperimenti utilizzando piante della varietà Red Setter allevate in diverse condizioni sperimentali. Giovani piantine di pomodoro sono state allevate fuori suolo in coltura idroponica e sottoposte a stress idrico e salino mediante trattamenti con PEG (polietilenglicole) e NaCl addizionato alla soluzione nutritiva per un massimo di 48 ore. Un altro gruppo di piante è stato allevato in terreno in vaso in serra e sottoposto a stress idrico indotto dalla sospensione dell'irrigazione per 16 giorni. Ulteriori esperimenti sono stati condotti su piante allevate in pieno campo e alle quali, in fase di fioritura, è stata sospesa l'irrigazione per 30 e 45 giorni.

Foglie di piante sottoposte alle diverse condizioni sperimentali sono state quindi utilizzate per una dettagliata caratterizzazione fisiologica, biochimica e molecolare, al fine di studiare il ruolo della G6PDH e di collegare l'attività enzimatica con i meccanismi di risposta generale delle piante a stress idrico.

3.2.1 CARATTERIZZAZIONE (FISIOLOGICA, BIOCHIMICA E MOLECOLARE) DELLA RISPOSTA A STRESS IDRICO DI BREVE E LUNGA DURATA IN POMODORO

Conduttanza stomatica

Al fine di valutare lo stato fisiologico delle piante durante le fasi di stress imposte nei diversi sistemi utilizzati, è stata monitorata la capacità di traspirazione valutando la conduttanza stomatica fogliare (gs). Come mostrato in Tab. 18, in coltura idroponica le piante controllo come atteso mantengono una conduttanza stomatica costante lungo tutta la durata dell'esperimento. Già dopo 3h dall'insorgenza dello stress le piante trattate con PEG 15% mostrano una riduzione della conduttanza stomatica del 72% rispetto ai valori alle piante controllo. Al termine delle 48h di osservazione è evidenziabile una riduzione della conduttanza stomatica del 90% sia per le piante trattate con PEG che con NaCl. Simili livelli di gs sono evidenziabili anche in seguito a stress idrico prolungato in suolo dopo 16 giorni di sospensione dell'irrigazione. Infine per le piante allevate in campo in assenza di irrigazione è riscontrabile una riduzione della conduttanza stomatica del 40-50 % rispetto i valori delle piante controllo già dopo 30 giorni.

Tabella 18: Conduttanza stomatica (gs) in foglie di pomodoro di piante allevate in differenti condizioni controllo e d'imposizione dello stress idrico. (*) = valori di ttest <0,05; (**) = valori di ttest <0,0005.

| Condizioni di crescita | | Conduttanza Stomatica, Gs (mmol s ⁻¹ m ⁻²) | | |
|------------------------|-----|---|----------------|--------|
| | | Controllo | Drought | % |
| Idrocultura | 0 | 111 ± 5,57 | 117,7 ± 15 | 6,01 |
| | 3h | 118,7 ± 10,6 | 32,8 ± 11,6 ** | -72,36 |
| | 6h | 124 ± 3,61 | 40,2 ± 10,9 ** | -67,58 |
| | 24h | 108,3 ± 3,21 | 17,9 ± 5,4 ** | -83,51 |
| | 48h | 127 ± 8,54 | 12,7 ± 1,2 ** | -90,03 |
| Serra | 16d | 222,3 ± 30,7 | 17,2 ± 2,31 ** | -92,28 |
| Campo | 30d | 419,5 ± 107,5 | 204,5 ± 55,3 * | -51,25 |
| | 45d | 242,2 ± 61,8 | 138,7 ± 69 * | -42,72 |

Contenuto di prolina

E' stato poi analizzato il contenuto in prolina delle foglie di pomodoro prelevate dai vari sistemi sperimentali per monitorare i cambiamenti nella osmoregolazione cellulare delle piante sottoposte a stress. Come mostrato in Fig. 25A, il contenuto di prolina raddoppia nelle piante sottoposte a stress idrico già dopo 6h dall'aggiunta di PEG e inoltre con l'intensificarsi della condizione di stress, i livelli di prolina aumentano di circa 11 volte dopo 24h e 27 volte dopo 48 ore. In modo più graduale anche le piante sottoposte a stress salino accumulano prolina e dopo 48h i livelli raggiungono valori simili quelli delle piante sottoposte allo stress idrico. Similmente il contenuto di prolina aumenta anche nelle piante allevate in serra sottoposte alla sospensione dell'irrigazione con un aumento dei livelli di circa 16 volte rispetto le piante controllo (Fig. 25B).

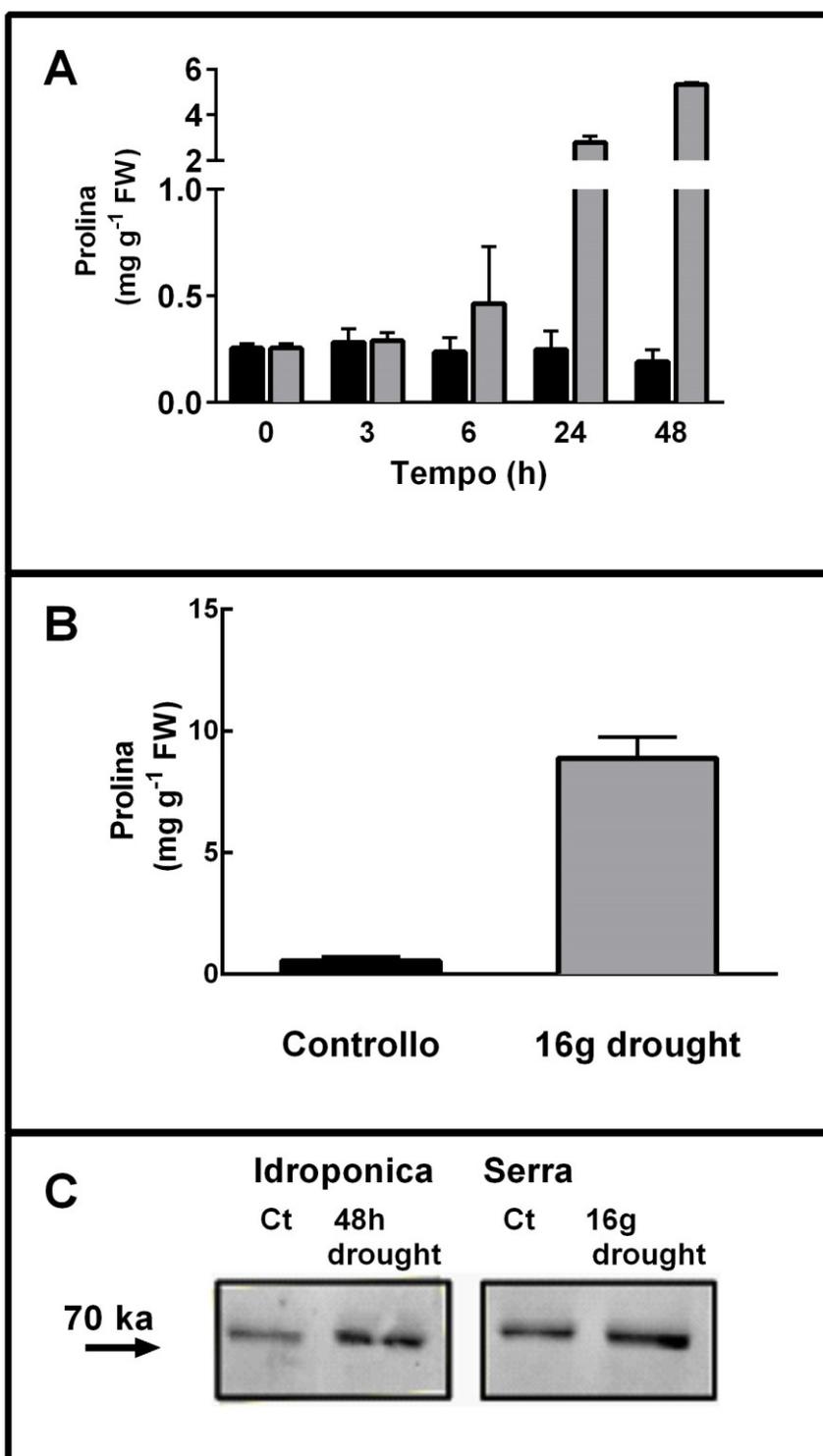


Figura 25: Caratterizzazione biochimica in piante di pomodoro sottoposte a stress idrico. Modificazioni dei livelli di Prolina in piante A) allevate in coltura idroponica in presenza di PEG 15%; B) allevate in serra in assenza di irrigazione per 16 giorni. I livelli di prolina sono indicati come mg/g di tessuto fresco in piante stressate (grigio) e piante controllo (nero). C) Accumulo delle HSP70 citosoliche determinato mediante analisi Western blotting.

Heat shock protein 70 kDa

E' stato inoltre valutato i livelli di accumulo di proteine tipiche della risposta allo stress. In particolare in seguito ai trattamenti effettuati sono stati valutati mediante analisi di Western Blotting i livelli delle HSP70 citosoliche (heat shock protein da 70kDa), proteine note per il loro coinvolgimento nella risposta ad ogni tipo di stress abiotico. I risultati (Fig. 25C) hanno indicato che lo stress idrico imposto, sia con i trattamenti con PEG sia riducendo l'irrigazione in serra, induce un aumento dei livelli delle Cy-HSP70 confermando che condizioni di stress idrico di breve e lunga durata inducono tipiche risposte regolate dalle condizioni di stress come l'accumulo di HSP70.

Espressione di geni correlati allo stress idrico

E' stato quindi effettuato uno studio dell'espressione di alcuni geni coinvolti in *pathway* metabolici noti per il loro coinvolgimento nei meccanismi cellulari di risposta a stress osmotico, in tutte le condizioni di stress imposto.

Allo scopo di verificare il coinvolgimento dell'ormone Acido Abscissico (ABA), è stata effettuata l'analisi dell'espressione genica, attraverso qRT-PCR del gene NCED (Solyc07g056570 - *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) e del gene PP2C (Solyc03g007230 - *Protein phosphatase 2C*). Come mostrato in Fig. 26A-B, in soluzione idroponica già dopo 3h dall'imposizione dello stress è riscontrabile un aumento dell'espressione genica di circa 3 e 32 volte nelle piante trattate rispettivamente con PEG e NaCl rispetto i controlli.

L'incremento riscontrato nelle piante sottoposte allo stress idrico si mantiene stabile per 24h, aumentando ulteriormente di circa 12 volte dopo 48h. Nelle piante sottoposte a stress salino invece la differenza di espressione genica tra piante trattate

e piante controllo diminuisce nelle 24h, per poi mantenersi dopo 48h a livelli simili a quelle delle piante trattate con PEG.

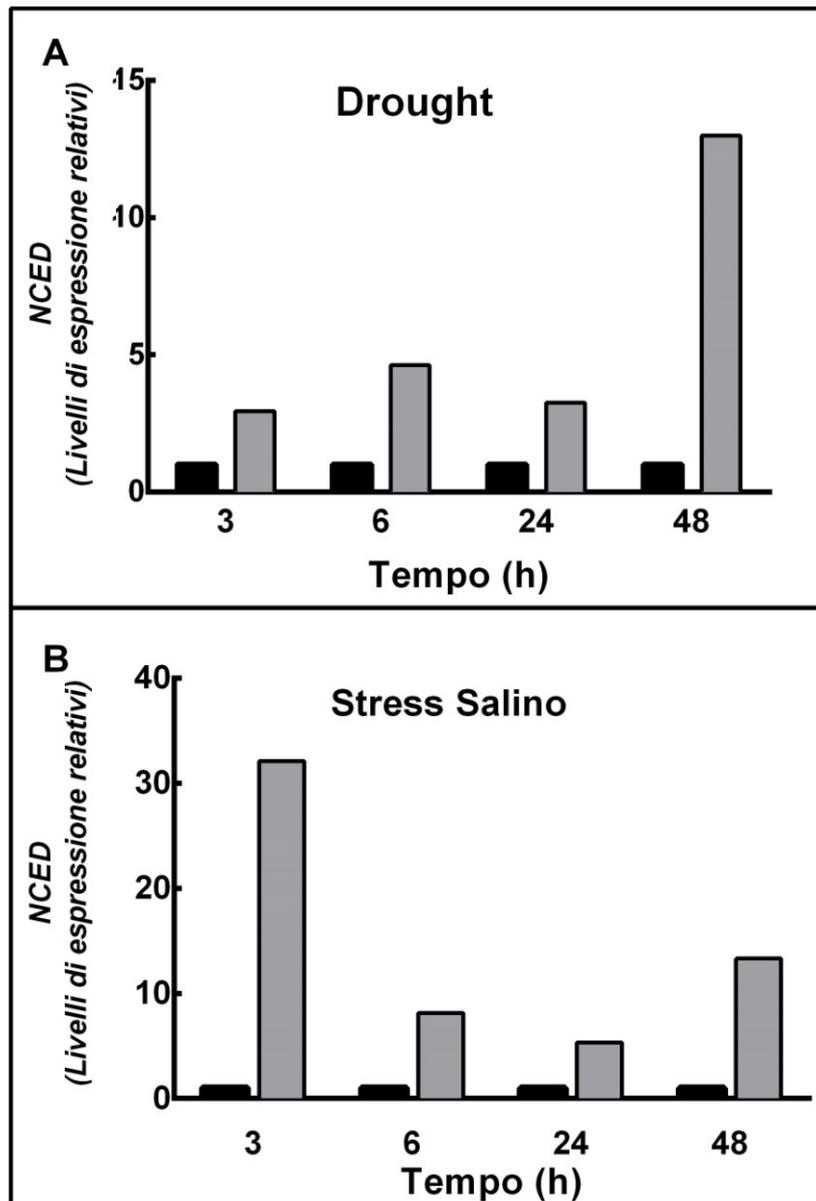


Figura 26: Espressione del gene NCED (*Solyc07g056570*) in piante di pomodoro allevate in coltura idroponica misurata attraverso qRT-PCR sottoposte a trattamento con A) PEG 15% e B) NaCl 150 mM. I livelli di espressione relativa dei campioni stressati (grigio) sono stati determinati rispetto quelli dei campioni controllo (nero).

Similmente anche le piante allevate in terreno e sottoposte a stress idrico indotto da assenza di irrigazione per 16 giorni mostrano un aumento dell'espressione genica del

gene NCED di circa 1,8 volte rispetto le piante controllo (Tab. 19). Inoltre anche il gene PP2C mostra un aumento dell'espressione genica di circa 300 volte dopo 48h in soluzione idroponica in presenza di PEG 15% e di 60 volte dopo 16 giorni in assenza di irrigazione in serra (Tab. 19). L'aumento dell'espressione dei due geni ha chiaramente dimostrato il coinvolgimento dell'ABA nei due sistemi sperimentali analizzati.

Come mostrato in Tab. 19 un aumento significativo dei livelli di espressione è stato riscontrato anche per il P5CS (*Solyc08g043170 - Pyrroline-5-carboxylate synthetase*) coinvolto nella biosintesi della prolina sia dopo 48h di trattamento con PEG sia dopo 16 giorni in assenza di irrigazione nel sistema di allevamento della serra in maniera simile a quanto mostrato dall'analisi del contenuto di prolina (Fig. 25A-B).

Infine per verificare l'attivazione del sistema di risposta allo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'espressione del gene di pomodoro APX, codificante per una ascorbato perossidasi (*Solyc09g007270*) è stata analizzata mediante qRT-PCR. I risultati hanno chiaramente mostrato un aumento dell'espressione di 243 volte dopo 48h di trattamento con PEG e di 14 volte in piante allevata in assenza di irrigazione per 16 giorni (Tab. 19).

Tabella 19: Espressione dei geni selezionati in piante di pomodoro allevate in idrocoltura (48h, PEG 15%) e in serra (16 giorni in assenza di irrigazione), attraverso qRT-PCR. I livelli di espressione relativa sono stati determinati rispetto quelli dei campioni controllo.

| Gene | Locus | Livelli di espressione relative | |
|----------|----------------|---------------------------------|----------------------|
| | | Drought 48h PEG 15% | Drought 16 giorni |
| Cy-G6PDH | Solyc02g093830 | 4,87 | 1,8 |
| NCED | Solyc07g056570 | 12,99 | 1,85 |
| P5CS | Solyc08g043170 | 2,74 | 1,68 |
| PP2C | Solyc03g007230 | 327,76 | 68,66 |
| APX | Solyc09g007270 | 242,71 | 13,8 |

3.2.2 IDENTIFICAZIONE DI SEQUENZE GENICHE DI G6PDH IN POMODORO

Al fine di studiare il coinvolgimento della G6PDH nei meccanismi di risposta a stress idrico è stato necessario utilizzare un preliminare approccio bioinformatico al fine di identificare i geni codificanti per la G6PDH in pomodoro. Pertanto è stata effettuata una ricerca per *key-words* in banca dati utilizzando il sito “Sol Genomics Network”, il database online dedicato alle solanacee, che ha portato all’identificazione di 5 geni codificanti per la G6PDH:

- Solyc01g100950
- Solyc01g100960
- Solyc02g093830
- Solyc05g015950
- Solyc07g045540

Allo scopo di assegnare questi 5 geni alle tre sottofamiglie note della G6PDH, le sequenze amminoacidiche codificate dai 5 geni sono state allineate a quelle derivanti da diverse piante superiori, tra cui *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera*, *Zea mays*, *Prunus persica*, utilizzando il software MUSCLE. Successivamente è stato effettuato un'analisi dei modelli di selezione ed è stato costruito un albero filogenetico senza radice (Fig. 27), utilizzando il metodo della massima verosimiglianza e il modello evolutivo JTT+G. L'analisi delle relazioni filogenetiche ha chiaramente indicato la suddivisione delle varie G6PDH di pianta in tre rami principali che includono: le G6PDH inattive definite P0, le G6PDH citosoliche definite cy-G6PDH e quelle localizzate nei compartimenti intracellulari. Quest'ultimo ramo si suddivide ulteriormente in due sotto-rami rappresentati dalle G6PDH cloroplastiche definite P1, e dalle G6PDH dei plastidi non fotosintetici definite P2. Per quanto riguarda le G6PDH in *Solanum lycopersicum*, i geni Solyc01g100950 e Solyc01g100960 si identificano con le isoforme inattive, il gene Solyc02g0939830 si identifica con le isoforme citosoliche, il gene Solyc0501950 con le isoforme plastidiali e il gene Solyc07g04540 con le isoforme cloroplastiche. Gli ultimi due geni, come atteso, presentano il peptide di transito per il traslocamento all'interno degli organelli. Come atteso le G6PDH derivati da pomodoro e patata sono raggruppate vicine con un bootstrap 100, a dimostrare la vicinanza evolutiva delle due *Solanacee*.

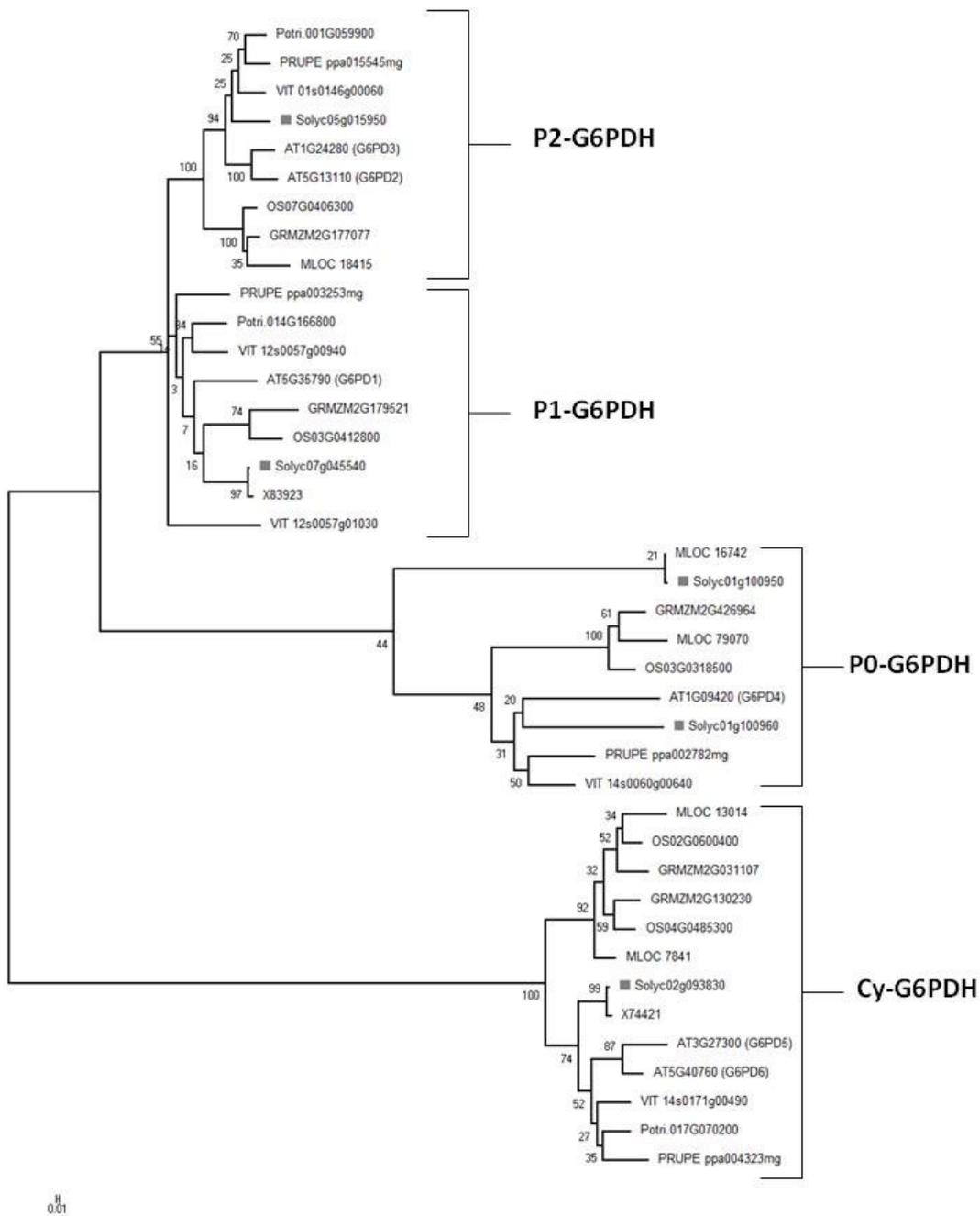


Figura 27: Albero filogenetico, senza radice, delle sequenze proteiche della G6PDH di varie piante superiori. I riquadri grigi identificano i geni di pomodoro. Le *accession number* delle sequenze utilizzate presentano le seguenti abbreviazioni: AT, *Arabidopsis thaliana*; GRMZM, *Zea mais*; MLOC, *Hordeum vulgare*; PoTri, *Populus trichocarpa*; PROPE, *Prunus persica*; Solyc, *Solanum lycopersicum*; OS, *Oryza sativa*; VIT, *Vitis vinifera*; X, *Solanum tuberosum*. I diversi cluster sono raggruppati in P2-G6PDH = isoforma plastidiale; P1-G6PDH = isoforma cloro plastica; Cy-G6PDH = isoforma cloro plastica; P0-G6PDH = isoforma inattiva.

3.2.3 G6PDH E RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN POMODORO

Lo studio del coinvolgimento dell'enzima G6PDH nella risposta a stress da carenza idrica è stato basato, sulla valutazione dell'attività enzimatica totale della G6PDH, l'analisi Western Blotting, utilizzando anticorpi specifici per la cyt-G6PDH di patata e sull'analisi dell'espressione genica della cyt-G6PDH di pomodoro (Solyc02g093830) tramite qRT-PCR. Come evidenziato dalla Fig. 28A, nelle foglie prelevate da piante allevate in sistema di coltura di idroponica l'analisi dell'attività enzimatica totale ha mostrato nelle piante trattate con PEG per 3h e 24h un graduale, statisticamente significativo, incremento dell'attività enzimatica. Dopo 48h il valore di attività enzimatica totale raggiunge il valore di di 6,73 U/mg di tessuto fresco; mentre nelle piante controllo i livelli di attività enzimatica totale restano costanti per tutta la durata delle osservazioni. Similmente le piante *drought* dopo 16 giorni di interruzione dell'irrigazione in serra hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica totale di circa 4,2 volte rispetto le piante controllo (Fig. 28B).

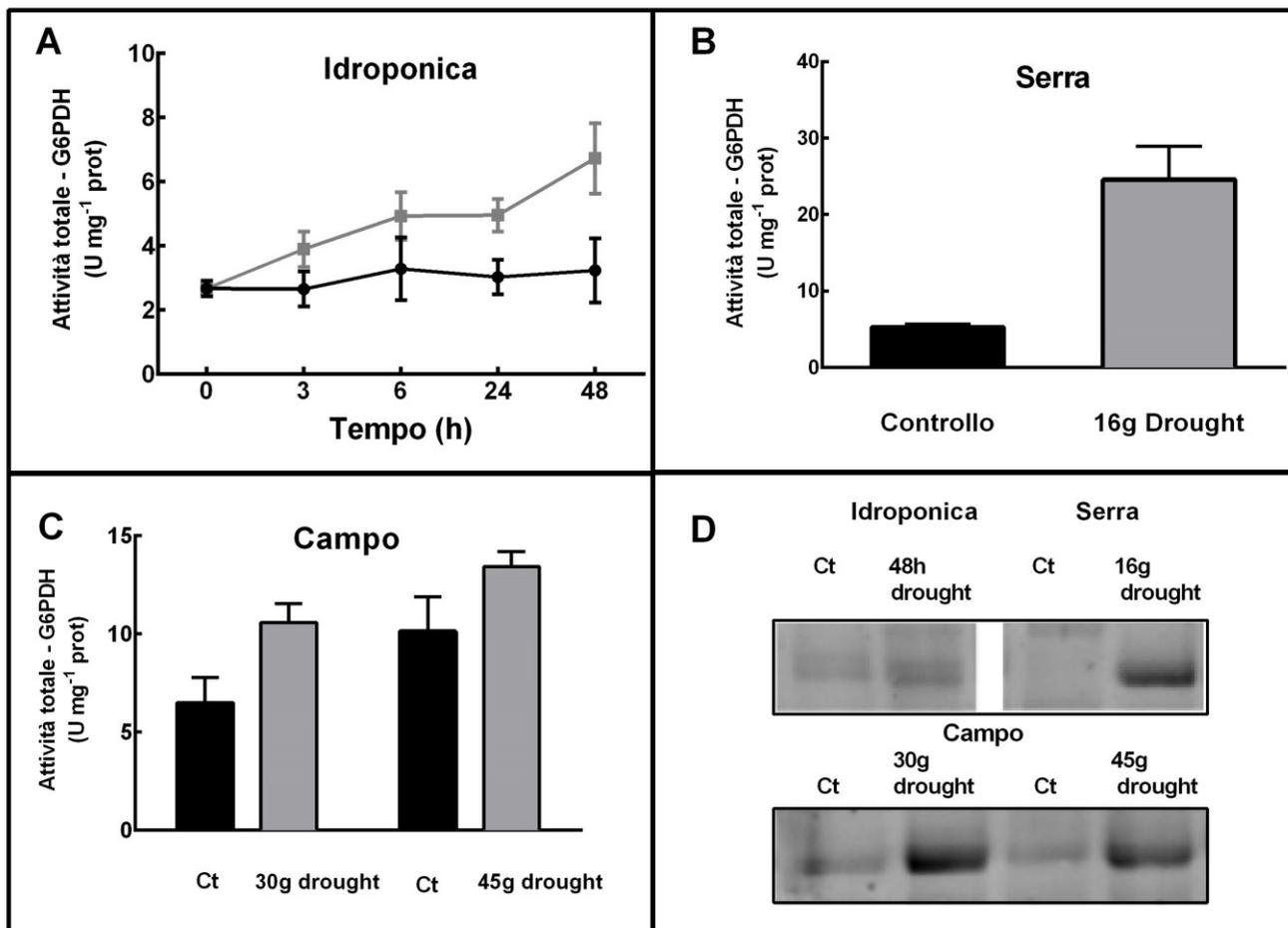


Figura 28: Effetto dello stress idrico sull'attività enzimatica e i livelli proteici della G6PDH. Modificazione dell'attività enzimatica totale della G6PDH in A) Piante di pomodoro giovani allevate in idrocoltura e sottoposte a trattamento con PEG 15%. B) Piante di pomodoro adulte allevate in serra per 16 giorni in assenza di irrigazione. C) Piante di pomodoro adulte allevate in campo aperto in assenza di irrigazione per 30 e 45 giorni. D) Livelli proteici della G6PDH citosolica rilevati mediante Western-blotting, utilizzando anticorpi contro la cy-G6PDH di patata. I livelli di attività enzimatica sono indicati come U mg⁻¹ di proteina in piante controllo (nero) e piante stressate (grigio).

Un aumento significativo è stato riscontrato anche in risposta a stress idrico in campo.

L'assenza di irrigazione per 30 e 45 giorni hanno induce un incremento di circa 1,67 e 1,32 volte dell'attività enzimatica, rispettivamente (Fig. 28C).

I valori di attività enzimatica sono state messe in correlazione con quelle dei livelli proteici. I risultati (Fig. 28D) hanno mostrano chiaramente un incremento dei livelli proteici di cy-G6PDH in tutte le condizioni sperimentali in cui è stato imposto lo stress

idrico. La correttezza dei risultati del western blotting è stata controllata attraverso un egual caricamento dei vari campioni e utilizzando come proteina controllo la subunità maggiore della rubisco (dato non mostrato).

Similmente le analisi di espressione genica hanno mostrato un andamento simile quelle dell'attività enzimatica totale. L'espressione del gene codificante per la cy-G6PDH aumenta di circa 2 volte già dopo 3h in presenza di PEG rispetto ai livelli delle piante controllo. Un ulteriore incremento di circa 4 volte è riscontrabile a 48h (Fig. 29A). Allo stesso modo l'espressione genica della cy-G6PDH aumenta di circa 1,8 volte nelle piante *drought* in vaso rispetto ai livelli delle piante controllo (Fig. 29B). Sia in serra che in coltura idroponica, i profili d'espressione dei geni Cy-G6PDH e NCED, mostrano un andamento simile, evidenziando una possibile regolazione comune dei pathway della G6PDH e dell'ABA.

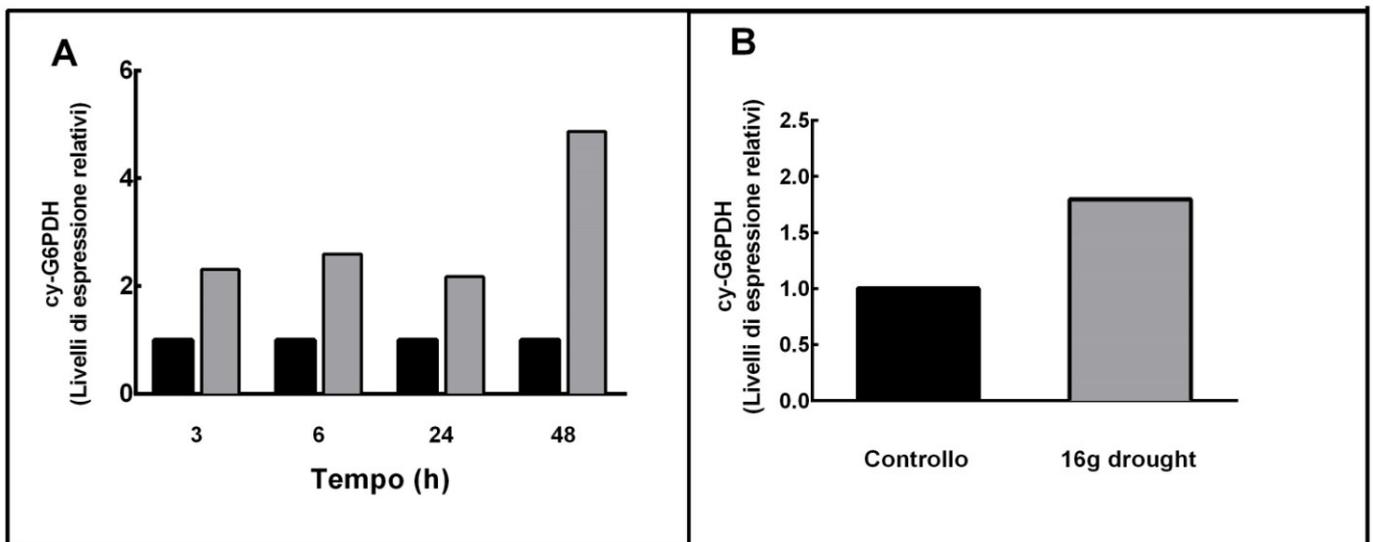


Figura 29: Modificazione dell'espressione del gene cy-G6PDH (*Solyc02g093830*) misurata attraverso qRT-PCR in piante di pomodoro allevate in: coltura idroponica e sottoposte a trattamento con PEG 15% (A), serra in assenza di irrigazione per 16 giorni (B). I livelli di espressione relativa dei campioni drought (grigio) sono stati determinati rispetto quelli dei campioni controllo (nero).

Al fine di confermare i risultati ottenuti dalla piante allevate in coltura idroponica, è stato analizzato anche il coinvolgimento della G6PDH nella risposta allo stress salino

indotto da aggiunta nella soluzione idroponica di NaCl 150 mM. In queste condizioni sperimentali l'espressione della cy-G6PDH aumenta di circa 5 volte già dopo 3h rispetto ai livelli di mRNA presenti nelle piante controllo. Successivamente quest'incremento diminuisce a 2 volte rispetto alle piante controllo per poi aumentare nuovamente di circa 4,5 volte dopo 48h. Anche l'attività enzimatica totale mostra un aumento nelle piante sottoposte a stress salino raggiungendo valori di 40 U/mg di tessuto fresco già a 24h e mantenendosi costante anche dopo 48h (Fig. 30A-B). Similmente a quanto già osservato per le piante sottoposte a stress idrico, anche le piante sottoposte a eccesso di NaCl mostrano per i geni cyt-G6PDH e NCED profili di espressione simili. Infine anche l'analisi western blotting ha mostrato un aumento dei livelli proteici di cyt-G6PDH in piante sottoposte a stress salino (dato non mostrato).

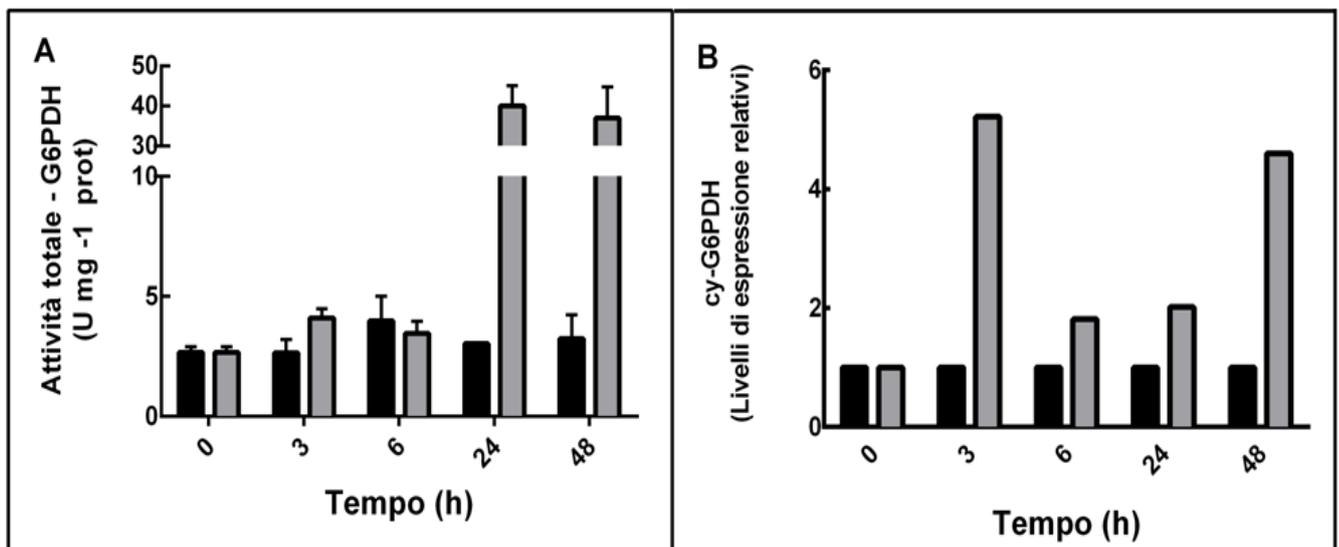


Figura 30: Effetto dello stress salino sull'attività della G6PDH (A) e dell'espressione genica (B) in piante di pomodoro allevate in coltura idroponica e sottoposte a stress salino utilizzando NaCl 150 mM. L'espressione genica della G6PDH è stata determinata attraverso qRT-PCR. I livelli di espressione relativa dei campioni stressati (barre grigie) sono stati determinati rispetto quelli dei campioni controllo (barre nere).

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE

La sfida più importante per l'agricoltura globale nei prossimi anni sarà quella di provvedere al fabbisogno alimentare per il sostentamento della popolazione mondiale in continua crescita (FAOSTAT2013). Questo è reso sempre più difficile dalla riduzione delle risorse ambientali disponibili, inclusa l'acqua, e dai cambiamenti climatici, che sempre più spesso inducono condizioni ambientali avverse improvvise e drammatiche (Ripoll *et al.*, 2014). In particolare, lo stress idrico rimane la principale causa limitante la crescita, lo sviluppo e la produzione delle specie coltivate (Reynolds & Tuberosa, 2008) e quindi la necessità di selezionare e sviluppare nuove varietà di piante coltivate tolleranti la siccità e capaci di mantenere elevate rese produttive rappresenta una importante e valida strategia per garantire la sostenibilità delle produzioni agricole (Boyer, 2010).

Queste considerazioni sono particolarmente urgenti anche in una importante specie coltivata come il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) che rappresenta la sesta coltura vegetale per importanza economica a livello mondiale (FAOSTAT 2013). Il pomodoro presenta diverse varietà coltivate dalle elevate potenzialità produttive ma molto sensibili al deficit idrico. In condizioni irrigue non ottimali tali varietà mostrano riduzione nello sviluppo e nella germinazione dei semi, riduzione della produttività e della qualità dei frutti (Nuruddin *et al.*, 2003; Bartels & Sunkar, 2005). Mentre originariamente il pomodoro è stato domesticato in Messico (Tanksley, 2004), ha successivamente trovato un elevato successo agricolo nell'area mediterranea, in particolare in Spagna ed Italia (Garcia-Martinez *et al.*, 2006). Se da un lato, caratteristiche di maggiore tolleranza allo stress idrico sono già presenti in specie selvatiche di pomodoro come *Solanum pennelli* (Bolger *et al.*, 2014) dall'altro è proprio nelle regioni semiaride del mediterraneo, storicamente soggette a fenomeni di

siccità (Galmes *et al.*, 2013), che si sono sviluppati ecotipi locali (Landraces) tolleranti. Tali varietà tradizionali costituiscono quindi un importante serbatoio di variabilità genetica utile per selezionare genotipi in grado di adattarsi a condizioni ambientali sempre più estreme e meno prevedibili. (Siracusa *et al.*, 2012; Siracusa *et al.*, 2013; Barbagallo *et al.*, 2013; Sacco *et al.*, 2015). Quindi da un lato sono fondamentali programmi di raccolta, identificazione e conservazione del germoplasma per evitare fenomeni di erosione genica e dall'altro come evidenziato nel presente progetto di dottorato, analisi accurate e approfondite delle caratteristiche molecolari, biochimiche e fisiologiche delle varietà territoriali dalla fitness più utile e funzionale. È importante però non dimenticare che l'utilizzo di landraces dall'elevata tolleranza allo stress abiotico non deve prescindere dalla capacità di mantenere allo stesso tempo elevate rese produttive. In tale ambito le analisi di produzione in campo svolte durante la tesi hanno chiaramente mostrato, come alcuni genotipi "da serbo" tipici della Campania e della Sicilia, come ad esempio i genotipi Giallo Beneventano, Crovarese, Lucariello e Locale Salina non risentano di condizioni di allevamento in regime idrico ridotto, condizioni che riducono fortemente la produttività di varietà industriali quali la varietà M82. Come accennato e ampiamente riportato in letteratura, condizioni di ridotto apporto idrico influenzano le principali componenti della produzione di pomodoro inclusa la qualità dei frutti (Ojeda *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2002; Bertin *et al.*, 2005; Prudent *et al.*, 2010; Ripoll *et al.*, 2014). In particolare il deficit idrico può causare nelle piante coltivate la produzione di frutti più piccoli, a seguito di una riduzione della divisione cellulare (McCarthy *et al.*, 2002) e nell'espansione cellulare (Ojeda *et al.*, 2001); un peggioramento della consistenza incidendo sulla *shelf life* e sulla trasportabilità (Causse *et al.*, 2003); ma soprattutto può ridurre le qualità nutrizionali e la disponibilità di composti "health-promoting" (Ripoll *et al.*, 2014). Al contrario i genotipi da serbo analizzati hanno mostrato:

una maggiore conservabilità dei frutti, rispetto le varietà da industria M82 e Red Setter, resistendo integri per diversi mesi, un maggior contenuto di zuccheri solubili e soprattutto che la concentrazione di composti quali carotenoidi, licopene, antiossidanti e polifenoli non ha risentito in maniera significativa della privazione d'acqua

4.1 MECCANISMI FISILOGICI E MOLECOLARI DELLA RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO IN VARIETÀ TRADIZIONALI DI POMODORO

Allo scopo di studiare, con un approccio integrato, le diverse componenti coinvolte nei meccanismi che regolano la risposta allo stress idrico prolungato in ecotipi in pomodoro, quattro ecotipi di pomodoro sono stati selezionati e caratterizzati da un punto di vista fisiologico, biochimico e molecolare durante l'allevamento in condizioni controllate in serra. Comprendere i meccanismi di tolleranza delle piante alla siccità rappresenta il passo iniziale e più importante per elaborare strategie volte a ottenere colture in grado di adattarsi alle avversità ambientali (Gong *et al.*, 2010; Iovieno *et al.*, 2016). Lo sviluppo di colture con una maggiore tolleranza alla siccità richiede la conoscenza dei complessi meccanismi fisiologici e genetici che regolano lo sviluppo e la produttività delle piante. La risposta alla carenza d'acqua nelle piante è regolata dall'intensità e dalla durata dall'imposizione della privazione (Pinheiro & Chaves, 2011) ed in particolare questa dipende da una complessa rete di risposte risultante dalla modificazione dell'espressione di un enorme numero di geni (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007; Gong *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014; Iovieno *et al.*, 2016).

Insieme ad una caratterizzazione dei meccanismi fisiologici coinvolti nella risposta a stress idrico prolungato, uno dei principali obiettivi di questo lavoro sperimentale è

stato l'identificazione del complesso network genico coinvolto e a tal fine due genotipi selezionati (Crovarese e Lucariello) sono stati utilizzati, per un approccio di analisi di genomica globale, mediante *RNA sequencing*. Tale approccio ha regalato una fotografia precisa delle modificazioni trascrittomiche necessarie alla risposta al deficit idrico in foglia. I risultati di quest'analisi confermano quanto affermato in letteratura ed hanno infatti mostrato che in pomodoro lo stimolo da privazione d'acqua induce nelle foglie una vasta e complessa modificazione dell'espressione genica che interessa circa 7800 geni, di cui circa 3800 sono risultati essere differenzialmente espressi nei due i genotipi analizzati. Risultati simili sono stati riscontrati in esperimenti di *RNA sequencing* in piante sottoposte a stress idrico in pera (*Pyrus betulaefolia*) dove sono stati identificati circa 7000 geni differenzialmente espressi nelle fasi precoci dello stress (Li *et al.*, 2016); in subera (*Quercus suber*) dove sono stati identificati circa 500 geni differenzialmente espressi tra fasi di piena irrigazione, stress idrico precoce ed intermedio (Magalhães *et al.*, 2016); nella pianta del tè (*Camelia sinensis*) dove sono stati identificati 6000 geni differenzialmente espressi sia tra piante irrigate e stressate, sia tra piante stressate e sottoposte a rewatering (Liu *et al.*, 2016); e nella manioca (*Manihot esculenta*) dove sono stati identificati 2800 geni differenzialmente espressi in piante allevate in presenza di PEG per simulare lo stress idrico (Fu *et al.*, 2015). Anche esperimenti di stress idrico imposto in mais effettuati utilizzando *microarray* hanno mostrato dati simili con l'identificazioni di circa 5500 geni coinvolti nella risposta a stress (Avramova *et al.*, 2015). In dettaglio, l'analisi RNA-sequencing nei genotipi Crovarese e Lucariello ha evidenziato tra i geni comuni maggiormente sovra-espressi numerosi geni già noti in letteratura per il loro coinvolgimento nella risposta allo stress idrico come ad esempio una Universal Stress Protein (Solyc01g057000 - Loukehaich *et*

al., 2012), una LEA proteins (Solyc03g116390 - Gong *et al.*, 2010), una acquaporina (Solyc03g019820 - Reuscher *et al.*, 2013) e molti altri.

Se da un lato lo stimolo dato dallo stress idrico ha indotto l'up-regolazione di migliaia di geni dall'altro appare chiaro come lo stress da privazione d'acqua causi una consistente regolazione negativa dell'espressione genica. Questo si riflette nell'inibizione di alcune funzioni basilari della pianta ed in particolare nell'arresto dei processi fisiologici principali, quali la fotosintesi, e l'accrescimento della pianta. Tali effetti, come è noto, contribuiscono in gran parte alla perdita di produttività nelle piante sottoposte a stress idrico (Jones & Corlett, 1992). Entrambe le funzioni citate sono state studiate sia a livello fisiologico sulle piante allevate *in vivo*, che a livello molecolare attraverso l'analisi RNA-seq. L'analisi delle piante allevate in condizioni di stress idrico prolungato ha mostrato che i parametri legati agli scambi gassosi sono drasticamente diminuiti per tutti i genotipi con una severa riduzione della conduttanza stomatica e della fotosintesi. Questa è tra le prime risposte allo stress idrico, la quale consente di proteggere le piante dalla perdita eccessiva d'acqua (Shinozaki *et al.*, 2007). Tale situazione potrebbe causare infatti la disidratazione cellulare, la cavitazione nello xilema e la morte della pianta stessa. I risultati di *RNA sequencing* hanno mostrato una perturbazione del trascrittoma di foglie di pomodoro tale da modificare l'espressione di centinaia di geni coinvolti nelle varie fasi della fotosintesi e dei processi metabolici correlati, e un conseguente arricchimento di categorie GO quali *Tetrapyrrol binding*, *Chlorophyll binding*, *Photosystem* e *Photosynthesis* utilizzando il *dataset* di geni down-regolati. Analisi di arricchimento GO con risultati analoghi sono riportate in letteratura (Iovieno *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Una simile down-regolazione dei geni relativi la fotosintesi è stata inoltre osservata anche in piante di

Arabidopsis sottoposte progressivamente a situazioni di stress idrico moderato (Harb *et al.*, 2010).

Pertanto la salvaguardia dell'apparato fotosintetico rimane un punto focale per la tolleranza allo stress idrico (Chaves & Oliveira 2004). In particolare i genotipi tolleranti utilizzati per l'esperimento di RNA-seq hanno mostrato una maggiore capacità di rispondere al danno ai fotosistemi mostrando livelli di espressione relativa maggiori rispetto quelli del genotipo determinato Red-Setter per il gene Solyc03g112590 (*Cell division protease ftsH homolog*), codificante per una proteina in grado da agire nel processo di riparazione del fotosistema II in presenza di danno ossidativo indotto dalla *drought* (Lindhal *et al.*, 2000). Una simile up-regolazione di questo gene è infatti stata mostrata da Zhang *et al.* (2014) in *Medicago truncatula* in risposta condizioni di stress idrico. La chiusura degli stomi e la relativa riduzione dell'efficienza fotosintetica sono state correlate nei genotipi analizzati ad un forte accumulo di acido abscissico (ABA). L'ABA rappresenta il fitoregolatore vegetale più importante per la risposta allo stress (Mehotra *et al.*, 2014), inducendo la regolazione genica di numerosi effettori di risposta e inducendo la chiusura stomatica. I genotipi analizzati nel presente lavoro hanno mostrato tutti un considerevole aumento dei livelli di ABA nelle fasi sperimentali di privazione d'acqua (S1 e S2), con conseguente attivazione del sistema di risposta alla siccità. Al contempo però i due genotipi Lucariello e Crovarese, utilizzati per l'analisi RNA-sequencing, hanno mostrato un incremento inferiore, probabilmente per una minor responsività alle condizioni di stress imposte. A livello molecolare sono stati identificati 34 geni differenzialmente espressi coinvolti nei vari processi relativi al metabolismo e *signaling* dell'ABA, 24 up-regolati coinvolti nella biosintesi (NCED4 - Solyc08g075490; CCD1a - Solyc01g087250 ad es.), nella trasduzione del segnale (snRK2

- Solyc08g077780, PP2C - Solyc03g007230 ad es.) e nella trascrizione (Bzip tf - Solyc04g078840 ad es.). Mentre 10 geni sono risultati down-regolati, tra i quali sono stati identificati i recettori dell'ABA (PYL 4, PYL 8, PYL 9 e PYR 1), sintomo della raggiunta condizione di stress prolungato e il conseguente inizio della regolazione a feed-back negativa del *pathway* di questo fitoregolatore vegetale (Xiom & Zhu, 2003). In letteratura sono stati descritti risultati simili relativamente ai geni up (Li *et al.*, 2016) e down regolati (Iovieno *et al.*, 2016). L'accumulo di ABA è contemporaneo all'aumento del contenuto di prolina, che si accumula maggiormente nei genotipi indeterminati (Beneventano, Crovarese, Lucariello) sintomo di una maggiore adattabilità alla privazione d'acqua. L'accumulo di prolina, come altri importanti osmoliti, rappresenta infatti una delle primarie e principali risposte allo stress osmotico al fine di regolare l'efflusso/influsso d'acqua e proteggere l'integrità cellulare e delle membrane (Burg & Ferraris, 2008). Un ulteriore effetto dell'accumulo di ABA è la riduzione dell'espansione fogliare (Fisher, 2012). Questa come la riduzione fotosintetica appare direttamente collegata alla chiusura stomatica al fine di preservare l'acqua intracellulare (Avramova *et al.*, 2015) ed è causa della riduzione del 60% della resa produttiva in mais (Ribaut *et al.*, 1997). I risultati del Leaf Area Index (LAI) ottenuti nel presente lavoro, indicano che in tutti i genotipi di pomodoro utilizzati una delle risposte primarie alla privazione d'acqua è la riduzione dell'accrescimento. Risultati analoghi in termini di riduzione dell'accrescimento fogliare in risposta a condizioni di deficit idrico sono stati riportati in piante di mais (Avramova *et al.*, 2015) e pomodoro (Iovieno *et al.*, 2016). In particolare i risultati ottenuti a livello morfologico sono possibilmente correlati alla down-regolazione dell'espressione di 73 geni collegati alla regolazione della divisione e del ciclo cellulare e al *pathway* di

trasduzione del segnale delle auxine. In particolare appare chiaro che l'inibizione dell'attività dell'auxina sembra essere il fattore primario per la riduzione dell'accrescimento fogliare (Keller *et al.*, 2004). Infatti piante di *Arabidopsis* trattate con inibitori delle auxine somministrati per la simulazione di uno stress abiotico hanno mostrato un comportamento simile all'imposizione di uno stress idrico attraverso la riduzione del LAI e del peso secco (Higashide *et al.*, 2014).

Parallelamente agli esperimenti effettuati nelle fasi di stress (S1 e S2) quelli effettuati nella fase di recupero (RW) hanno consentito di mimare, in un ambiente semi-controllato come quello della serra, le condizioni di campo dove sempre più frequentemente durante la coltivazione si alternano periodi caratterizzati da prolungata siccità a brevi periodi di disponibilità idrica. Tuttavia, seppur gli studi sui meccanismi di risposta allo stress idrico seguito da una fase di recupero mediante *rewatering* siano ancora pochi, recenti analisi di RNA-sequencing riportate in letteratura hanno mostrato come analogamente alle fasi di stress severo, la fase di recupero induca la modificazione dell'espressione di migliaia di geni (Iovieno *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016), dimostrando come atteso che la capacità di recupero della pianta dopo periodi di stress idrico sia un importante fattore di tolleranza, le cui basi genetiche sono ancora in gran parte da definire. I risultati delle analisi fisiologiche, molecolari e biochimiche condotte in questo lavoro dopo la ripresa dell'irrigazione per 9 giorni (punto sperimentale RW) hanno mostrato per alcuni parametri analizzati che le piante del genotipo Red Setter, a sviluppo determinato e meno tollerante, abbiano recuperato in maniera meno efficiente rispetto le piante dei genotipi da serbo. Al contrario i genotipi selezionati per l'analisi RNA-seq hanno mostrato pieno recupero delle funzionalità biochimiche, molecolari e fisiologiche durante la fase di *rewatering*.

Mentre la visione complessiva dei dati trascrittomici ottenuti mediante l'analisi RNA-seq insieme ai dati fisiologici e biochimici ha consentito di ottenere una panoramica globale dei processi funzionali attivati/ disattivati in risposta alla siccità, i dati RNA-seq e la disponibilità di banche dati genomiche relativi al pomodoro hanno consentito nel presente lavoro di tesi una approfondita caratterizzazione di alcune famiglie proteiche di particolare importanza nella risposta agli stress abiotici. L'analisi di arricchimento GO utilizzando i *dataset* di geni up-regolati, ha individuato categorie dall'elevato *enrichment score* quali *Response to water*, *Response to abiotic stress* che raggruppano geni con funzioni chiave nella risposta alle sopracitate condizioni di stress. All'interno di queste categorie sono stati identificati geni codificanti per proteine con putativo ruolo di protezione delle strutture cellulari quali le LEA proteins (Tunnacliffe & Wise, 2007). Studi precedentemente condotti avevano riportato l'identificazione di 27 geni codificanti per proteine LEA in *Solanum Lycopersicum* (Cao & Li, 2015), numero insufficiente alla luce di studi effettuati in altre specie vegetali. E'infatti noto che in *Arabidopsis* sono stati identificati 51 geni codificanti proteine LEA (Hundertmark & Hinch, 2008) mentre in arancia e patata sono stati identificati rispettivamente 72 e 29 geni (Charfeddine *et al.*, 2015; Pedrosa *et al.*, 2015). Al fine di poter identificare tutte le LEA proteins di pomodoro, è stato quindi sviluppato un approccio bioinformatico che ha portato all'elaborazione di un albero filogenetico in cui sono state identificati 37 geni codificanti per proteine LEA in pomodoro, raggruppati in 7 sottofamiglie proteiche (LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, Deidrine e *Seed Maturation Protein*). Il coinvolgimento di questi geni in risposta allo stress idrico è stato provato analizzando i dati trascrittomici che hanno consentito l'identificazione di 15 geni per il genotipo Crovarese e 14 per il genotipo Lucariello la cui espressione è

regolata da condizioni di stress idrico. In particolare le sottofamiglie maggiormente coinvolte nella risposta al deficit idrico sono risultate essere le LEA4 e le deidrine. Analisi di RNA-seq riportate in letteratura hanno mostrato modificazioni simili dell'espressione delle proteine LEA (Iovieno *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 2016). Risultati analoghi sono stati confermati in letteratura per 3 (Solyc02g085150, Solyc04g082200, Solyc12g010820) dei 15 geni differenzialmente espressi identificati nel lavoro di tesi, mediante analisi di qRT-PCR condotte in piante di pomodoro sottoposte a stress idrico e salino (Cao & Li, 2015).

Un ulteriore aspetto molto importante della risposta a condizioni di siccità è la regolazione della parete cellulare (Tenhaken, 2015). L'analisi di arricchimento GO condotta nel presente lavoro, utilizzando i dataset di geni down-regolati, ha individuato categorie dall'elevato *enrichment score* quali *Cell wall*, *Cell wall modification*, *Cell wall organization* e *Pectinesterase activity*. Sono stati infatti identificati 134 geni differenzialmente espressi relativi la parete cellulare. Di questi sono stati identificati 41 geni e 39 geni, rispettivamente appartenenti ai processi di degradazione e modificazione della parete cellulare inclusi geni codificanti per espansine, pectinesterasi, pectato liasi, endoglucanasi, β -glucosidasi e molti altri. L'87% di questi geni è risultato essere fortemente down-regolato. Questo comportamento ha indicato che la parete cellulare necessita di mantenere invariata la sua composizione durante la siccità al fine di rimanere compatta e evitare la perdita d'acqua. Una particolare famiglia proteica coinvolta nella degradazione e modificazione della parete cellulare è quella delle pectinasi che è risultata essere una delle famiglie maggiormente rappresentate nel data-set di geni down-regolati. Questa famiglia si compone di enzimi come le pectinesterasi, le pectato-acetyl-transferasi, le

pectato liasi e le poligalatturonasi. Queste proteine sono note in letteratura per il loro ruolo nella maturazione dei frutti (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002), ma è stato ulteriormente ipotizzato il loro coinvolgimento nella risposta agli stress abiotici (Hong *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Infatti la sovra-espressione delle poligalatturonasi in *Arabidopsis* promuoverebbe la degradazione della lamella mediana della parete cellulare, aumentando la sensibilità agli stress abiotici (Liu *et al.*, 2010). I risultati descritti in questo lavoro ottenuti mediante RNA-sequencing e qRT-PCR mostrano da un lato che tutti gli enzimi appartenenti alla famiglia delle pectinasi (un gruppo di proteine in grado di depolimerizzare la pectina) risultano fortemente down-regolati, proprio a dimostrare che la repressione di questi enzimi risulta necessaria per fortificare la parete cellulare e evitare la perdita d'acqua. La pectina infatti rappresenta il costituente principale della parete cellulare. La sua degradazione viene promossa da enzimi come le pectinesterasi che inducono la depolimerizzazione della pectina in polimeri più piccoli di Acido pectico (pectato) e le pectato liasi e le poligalatturonasi che a partire dall'acido pectico formano monomeri di acido galatturonico (Chen *et al.*, 2015). Inoltre la caratterizzazione dell'espressione approfondita dei 3 enzimi (Solyc01g079180, Solyc05g014000, Solyc09g075460) ha mostrato come nei genotipi tradizionali Crovarese e Lucariello la repressione di questi sia maggiore rispetto quella riscontrata nel genotipo Red Setter in entrambe le fasi sperimentali di stress imposto (S1 e S2). Inoltre durante la fase sperimentale di RW i 3 geni analizzati nei genotipi tradizionali, risultano up regolati aumentando la loro espressione nelle piante *drought* rispetto quelle controllo. Questo comportamento non è stato riscontrato nel genotipo Red Setter. E' possibile ipotizzare una maggiore versatilità della parete cellulare dei genotipi Crovarese e Lucariello, al fine di bloccare la degradazione della parete,

rendendola più compatta nelle fasi di stress severo; e al fine di promuovere invece la degradazione della parete cellulare più efficientemente durante la fase di recupero (*rewatering*) e permettere il conseguente maggior ingresso d'acqua una volta resa questa disponibile. Comportamenti analoghi di modificazione dell'espressione in risposta a stress abiotici e biotici sono evidenziati per alcuni geni orologi in *Arabidopsis* (Ascencio-ibanez *et al.*, 2008; Cao, 2012).

E'importante infine sottolineare che i risultati di RNA-seq ottenuti nel presente lavoro hanno mostrato inoltre l'importanza dei progetti di *re-sequencing* di varietà o ecotipi di specie vegetali già sequenziate. L'utilizzo dei genomi specifici dei due genotipi Crovarese e Lucariello, per il processo di mappaggio delle *reads* ha aumentato la precisione e la sensibilità dell'analisi permettendo di eliminare una serie di geni falsi positivi che erano risultati differenzialmente espressi utilizzando il genoma della varietà Heinz (*The Tomato Genome Consortium*, 2012), generalmente utilizzato come riferimento in esperimenti di RNA-seq di pomodoro (Iovieno *et al.*, 2016) e di identificare una serie di geni precedentemente annotati in modo non corretto sul genoma di Heinz. Recenti studi di trascrittomiche associate a progetti di *re-sequencing* sono stati realizzati con diverse finalità (Baduell *et al.*, 2016; Maldonado Dos Santos *et al.*, 2016). Pertanto i risultati del presente lavoro, i recenti studi pubblicati in letteratura e l'abbattimento dei costi di sequenziamento, indicano che studi di trascrittomiche mediante NGS associati a progetti di *re-sequencing* sono sempre più auspicabili per finalità di ricerca in campo bio-agronomico.

Nel complesso i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi, indicano che gli ecotipi di pomodoro da serbo si adattano alle condizioni di carenza idrica in maniera molto più efficiente rispetto varietà di pomodoro da industria, mediante la regolazione di un consistente network di geni coinvolti in vie biosintetiche chiave e nella percezione e trasduzione del segnale in funzione dell'intensità dello stress, in stretta coordinazione con il proprio macchinario fisiologico e biochimico. In tali varietà tradizionali la complessa rete di modificazioni indotte per rispondere alla condizione di stress non ha influenzato la capacità produttiva e la qualità dei frutti a conferma che le piante dei genotipi tradizionali sono in grado di attivare meccanismi di adattamento utili per il mantenimento dei livelli di produzione anche in condizioni ambientali sub-ottimali. I genotipi di pomodoro da serbo, analizzati in questo lavoro di dottorato, si sono rivelati quindi una buona fonte di geni e meccanismi genetici utili per migliorare varietà di pomodoro scarsamente tolleranti a condizioni di stress idrico moderato e severo.

Inoltre i risultati riportati consentono di ampliare le conoscenze riguardo la risposta fisiologica, molecolare e biochimica del pomodoro a condizioni di stress idrico con l'identificazione del completo set di geni influenzati dalle condizioni di stress e che e potranno essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi genotipi di pomodoro dotati di maggiore tolleranza utilizzando programmi innovativi di miglioramento genetico basati sulle conoscenze di genomica strutturale e funzionale recentemente sviluppate in questa specie. Contemporaneamente due famiglie geniche molto importanti come quelle delle LEA e delle pectinasi sono state caratterizzate in dettaglio mostrando come il loro apporto in risposta allo stress idrico sia fondamentale per l'attivazione delle risposte di resistenza/tolleranza a condizioni di privazione d'acqua prolungate.

Infine le informazioni delle modificazione trascrittomiche evidenziate potranno ulteriormente essere approfondite per identificare ulteriori famiglie geniche di interesse e con ruolo importante nella risposta a stress. In particolare ulteriori studi sono richiesti per un'analisi mirata degli eventi fisiologici e molecolari caratterizzanti le fasi precoci di risposta allo stress; inoltre ulteriori studi di biologia molecolare avanzata potranno essere disegnati per uno studio mirato sui geni la cui espressione risulta modificata durante fase di recupero.

4.2 STUDIO DEL RUOLO DELL'ENZIMA GLUCOSIO 6 FOSFATO DEIDROGENASI IN RISPOSTA ALLO STRESS IDRICO

L'obiettivo della seconda parte del lavoro di tesi è stato quello di indagare il coinvolgimento dell'enzima G6PDH nella risposta allo stress idrico. Per la prima volta un'analisi di questo tipo è stata condotta utilizzando tre differenti sistemi sperimentali di allevamento in un'importante specie ortiva coltivata come il pomodoro per uno studio dettagliato in diverse fasi di sviluppo e sottoponendo le piante a stress di diversa intensità e durata. I risultati hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica della G6PDH in tutte le condizioni testate. Quest'incremento è stato riscontrato sia nelle fasi precoci dello stress (allevamento in idrocoltura) sia durante la privazione d'acqua prolungata nelle condizioni di allevamento in serra e campo. Pertanto i saggi enzimatici relativi l'attività enzimatica indicano che la G6PDH gioca un putativo ruolo centrale per contrastare lo stress ossidativo indotto dalla privazione d'acqua. E' infatti noto che il NADPH è il principale riducente necessario nel ciclo ascorbato-glutatione (Letterrie *et al.*, 2007) e che la G6PDH rappresenta la maggior fonte di NADPH nelle cellule vegetali.

L'attività totale della G6PDH è, come noto, ascrivibile per la maggior parte all'isoforma citosolica (Esposito, 2001). Quest'attività è principalmente coinvolta nella preservazione del metabolismo cellulare basale (Esposito, 2005), ma un ruolo di primo piano per la cy-G6PDH è stato dimostrato anche in risposta allo stress salino (Nemoto & Sasakuma, 2000; Dal Santo *et al.*, 2012; Cardi *et al.*, 2015). In questo lavoro per chiarire il ruolo della G6PDH citosolica anche in risposta allo stress idrico, e per correlare i dati di attività enzimatica a variazioni dell'espressione genica è stata valutata mediante analisi qRT-PCR la trascrizione del gene codificante la cy-G6PDH. L'identificazione di questo gene è stata effettuata utilizzando un approccio bioinformatico, che ha chiaramente mostrato che il gene Solyc02g093830 appartiene alla sottofamiglia delle cy-G6PDH delle dicotiledoni. A livello trascrizionale, è stato osservato un incremento dell'espressione della cy-G6PDH di pomodoro sin dalle fasi precoci dello stress ottenute mediante l'allevamento in coltura idroponico sino quelle prolungate verificate in serra e in campo. È importante inoltre sottolineare come i profili di espressione genica della cy-G6PDH e attività enzimatica totale presentano comportamenti simili insieme il contenuto proteico totale di cy-G6PDH rilevato tramite western blotting.

Il profilo di espressione della cy-G6PDH indica che il gene è maggiormente attivato nelle fasi precoci delle stress rispetto a quelle tardive. Al contrario l'aumento dell'attività enzimatica totale della G6PDH risulta maggiore durante lo stress prolungato. È quindi possibile ipotizzare l'attivazione di meccanismi regolativi che consentono di mantenere un'adeguata attività enzimatica durante condizioni di stress idrico prolungato indipendenti dalla regolazione trascrizionale. Al fine di valutare altri parametri connessi allo stress idrico, sono stati valutati il contenuto in prolina (Ashraf

& Foolad, 2007), l'espressione del gene P5CS (Sharma *et al.*, 2011), l'accumulo di HSP70 (Sruthy *et al.*, 2015) e la sintesi di ABA. Tutti questi parametri hanno confermato le condizioni di stress raggiunte dalle piante. Al fine di correlare la attivazione delle risposte a stress, l'accumulo di ABA e il coinvolgimento della G6PDH, è stata valutata l'espressione dei geni NCED e PP2C. Entrambi hanno un ruolo fondamentale nella tolleranza allo stress idrico, l'incremento dell'espressione del gene NCED infatti riduce la traspirazione nelle foglie migliorando la tolleranza alla privazione d'acqua (Thompson *et al.*, 2000). Similmente anche la sovra-espressione dei geni della famiglia PP2C riduce la sensibilità all'ABA migliorando la tolleranza allo stress idrico (Singh *et al.*, 2015). L'analisi qRT-PCR ha mostrato un incremento dell'espressione di questi geni insieme con i livelli di espressione mostrati dal gene cy-G6PDH, in accordo con la presenza di elementi ABRE (*ABA responsive elements*) nel promotore della G6PDH (Cardi *et al.*, 2011). L'attivazione del *pathway* di trasduzione dell'ABA è stato ulteriormente verificato analizzando la conduttanza stomatica. Un'estesa riduzione degli scambi gassosi è stata verificata nei sistemi sperimentali di idrocoltura e serra e una minore ma consistente riduzione è stata riscontrata anche nel sistema sperimentale del campo. La chiusura degli stomi, come atteso, è infatti una delle risposte primarie indotte dall'ABA a seguito dello stress idrico, al fine di ridurre la perdita di acqua (Shinozaki *et al.*, 2007).

E'possibile ipotizzare che il segnale indotto dalla privazione d'acqua, la cui presenza è dimostrata dall'incremento del contenuto di prolina e dei livelli di HSP70, è avvertito dall'ABA che induce, tra le varie risposte, l'espressione della cy-G6PDH, per supportare l'incremento della richiesta di NADPH in risposta allo stress ossidativo dovuto alla riduzione dei livelli di acqua, fabbisogno di NADPH che è stato in parte dimostrato

analizzando l'espressione dell'ascorbato perossidasi, uno dei principali enzimi antiossidanti di risposta alle specie reattive dell'ossigeno. L'espressione di tale gene, è risultata aumentata sia nella fasi precoci che nelle fasi tardive di stress in seguito alla maggiore richiesta di attività antiossidante utile per il mantenimento di un'adeguata attività fotosintetica in tali condizioni (Shigeoka, 2002; Krannich *et al.*, 2015).

La co-espressione dei diversi geni studiati (NCED, P5CS, PP2C, e APX) con quello della cy-G6PDH supporta il concetto dell'importante coinvolgimento della G6PDH nella risposta allo stress idrico. In conclusione, il coinvolgimento della G6PDH è stato chiaramente dimostrato in condizioni di stress idrico in pomodoro. Il ruolo centrale dell'attività della G6PDH durante lo stress ossidativo indotto dalla limitazione d'acqua è stato contemporaneamente definito in condizioni di idrocoltura, di allevamento in serra e in campo. I primi due approcci hanno mostrato i risultati più consistenti risultanti dalle condizioni sperimentali controllate ottenute mediante l'utilizzo dei due sistemi sperimentali. L'allevamento in campo, ha mostrato risultati meno marcati, per via delle naturali condizioni ambientali, ma lineari con i risultati ottenuti con le piante allevate in laboratorio/serra.

E'interessante sottolineare che, molte delle risposte osservate in seguito allo stress idrico sono analoghe, anche se in misura diversa agli effetti dovuti alla presenza di uno stress salino. Questo probabilmente conferma, insieme a studi precedenti (Nemoto & Sasakuma, 2000; Del Santo *et al.*, 2012; Cardi *et al.*, 2015 e molti altri), il complesso *pattern* di risposte agli stress abiotici in cui le varie isoforme della G6PDH sono coinvolte nelle piante. E'infatti possibile ipotizzare risposte di tipo e intensità differenti modulate da una serie di segnali strettamente connessi ai livelli di specie reattive dell'ossigeno, ABA e disponibilità di riducenti. Ulteriori studi saranno richiesti per chiarire completamente il *pathway* di risposta

allo stress, dalla ricezione dello stesso fino all'incremento dell'attività enzimatica, e del probabile meccanismo di regolazione a feedback degli equivalenti riducenti distribuiti dalla G6PDH.

CAPITOLO 5: BIBLIOGRAFIA

- **Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P.** 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins *Plant Molecular Biology* 59, 469–484.
- **Almoguera C, Jordano J.** 1992. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology* 19: 781-92.
- **Ambrosone A, Batelli G, Nurcato R, Aurilia V, Punzo P, Bangarusamy DK, Ruberti I, Sassi M, Leone A, Costa A, Grillo S.** 2015. The arabidopsis RNA-binding protein AtRGGGA regulates tolerance to salt and drought stress. *Plant Physiology* 168 (1):292-306
- **André RGB, Churata-Masca, MGC.** 1992. Water requirement and crop coefficient for processing tomatoes. *Acta Horticulturae* 301:165–170
- **Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L.** 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*
- **Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al.** 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology consortium. *Nature Genetics* 25 25–29 10.
- **Ashraf M, Foolad MR.** 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.
- **Avramova V, Abdelgawad H, Zhang Z, Fotschki B, Casadevall R, Vergauwen L, Knapen D, Taleisnik E, Guisez Y, Asard H, Beeemster GT.** 2015. Drought induces distinct growth response, protection and recovery mechanisms in the Maize leaf growth zone. *Plant Physiology*. 2:1382-96.

- **Badawi GH, Y. Yamauchi E, Shimada R, Sasaki N, Kawano K, Tanaka K.** 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts, *Plant Science*. 166 919e928.
- **Baduel P, Arnold B, Weisman CM, Hunter B, Bomblies K.** 2016. Habitat-associated life history and stress-tolerance variation in *Arabidopsis arenosa*. *Plant Physiology*. pii: pp.01875.2015.
- **Baradas MW.** 1994. Crop water requirements. *Tropical crops. Handbook of Agricultural Meteorology. Oxford University Press, Oxford, UK, 189–209.*
- **Barbagallo RN, Di Silvestro I, Patanè C.** 2013. Yield, physicochemical traits, antioxidant pattern, polyphenol oxidase activity and total visual quality of field-grown processing tomato cv. Brigade as affected by water stress in Mediterranean climate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (6):1449-57.
- **Bartels D, Sunkar R.** 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23–58.
- **Bertin N.** 2005. Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annals of Botany* 95, 439–447.
- **Bohnert HJ, Qingqiu G, Li P, Ma S.** 2006. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Current opinion of Plant Biology* 9:180–188.
- **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 15 :2114-20.
- **Bolger A, Scossa F, Bolger ME, et al.** 2014. The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* 46, 1034–1038.
- **Bowsher CG, Boulton EL, Rose J, Nayagam S, Emes MJ.** 1992. Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *The Plant Journal* 2, 893-898.

- **Boyer JS.** 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443-448.
- **Boyer JS.** 2010. Drought decision-making. *Journal of Experimental Botany* 61, 3493–34
- **Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E.** 2000. Responses to abiotic stresses in Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists* 1158–1249.
- **Burg MB, Ferraris JD.** 2008. Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 7309-7313.
- **Canene-Adams K., Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, Erdman JW.** 2005. The Tomato As a Functional Food. *Journal of Nutrition* 135, 1226–1230.
- **Cao J.** 2012. The pectin lyase in *Arabidopsis thaliana*: evolution, selection and expression profile. *PLoS One*. 7 (10).
- **Cao J, Li X.** 2015. Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* 241(3):757-72.
- **Cardi M, Chibani K, Cafasso D, Rouhier N, Jacquot JP, Esposito S.** 2011. Abscisic acid effects on activity and expression of different glucose 6 phosphate dehydrogenase isoforms in barley. (*Hordeum vulgare*). *Journal of Experimental Botany* 62,4013e4023.
- **Cardi M, Castiglia D, Ferrara M, Guerriero G, Chiurazzi M, Esposito S.** 2015. The effects of salt stress cause a diversion of basal metabolism in barley roots: possible different roles for glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*. 86:44-54.
- **Castiglia D, Cardi M, Landi S, Cafasso D, Esposito S.** 2015. Expression and characterization of a cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase isoform from barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Protein Expression and Purification* 112, 8–14.
- **Cause M, Buret M, Robini K, Verschave P.** 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science* 68, 2342–2350.

- **Charfeddine S, Saïdi MN, Charfeddine M, Gargouri-Bouزيد R.** 2015. Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. *Molecular Biology Report.* 7: 1163-74.
- **Chaves MM, Oliveira MM.** 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55 (407):2365-84.
- **Chen J, Liu W, Liu CM, Li T, Liang RH, Luo SJ.** 2015. Pectin modifications: a review. *Critical Review of Food Science Nutrition.* 55(12):1684-98.
- **Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R.** 2002. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) *Molecular Breeding.* 10:71–82.
- **Christiansen MN.** 1982. World environmental limitations to food and fiber culture. In **Christiansen MN and Lewis CF.** *Breeding plants for less favourable environments. Wiley Interscience,* 1-11.
- **Claussen W.** 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168, 241–248.
- **Close TJ, Kortt AA, Chandler PM.** 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced protein (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology* 13:95-108.
- **Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT.** 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322:1845–8.
- **Cushman JC, Bohnert HJ.** 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion Plant Biology* 3:117–124.
- **Dal Santo S, Stampfl H, Krasensky J, Kempa S, Gibon Y, Petutschnig E, Rozhon W, Heuck A, Clausen T, Jonak C.** 2012. Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*, *The Plant Cell* 24, 3380-3392.

- **Danielson JAH, Johanson U.** 2008. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 8, 1–15.
- **Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR.** 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 1:15-21.
- **Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z.** 2010. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research* 38.
- **Duan J, Cai W.** 2012. OsLEA3-2, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. *PLoS One* 7:e45117.
- **Dure L III, Greenway SC, Galau GA.** 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20:4162–4168.
- **Dure L III, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989)** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12:475–486.
- **Eckardt NA, Cominelli E, Galbiati, M, Tonelli C.** 2009. The future of science: Food and water for life. *Plant Cell* 21, 368–372.
- **Ercolano MR, Sacco A, Ferriello F, D'Alessandro R, Tononi P, Traini A, Barone A, Zago E, Chiusano ML, Buson G, Delledonne M, Frusciante L.** 2014. Patchwork sequencing of tomato San Marzano and Vesuviano varieties highlights genome-wide variations. *BMC Genomics*. 18;15:138.
- **Esposito S, Carfagna S, Massaro G, Vona V, Di Martino Rigano V.** 2001. Glucose-6P dehydrogenase in barley roots: kinetic properties and localization of the isoforms, *Planta* 212 (2001) 627–634.

- **Esposito S, Massaro G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S.** 2003. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta* 216, 639-647.
- **Esposito S, Guerriero G, Vona V, Di Martino Rigano V, Carfagna S, Rigano C.** 2005. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany* 56, 55-64.
- **Esposito S, Sorbo S, Conte B, Basile A.** 2012. Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70s induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* Hedw. *International Journal of Phytoremediation*, **14**, 443-455.
- **FAOSTAT 2013.** http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity.
- **Finkelstein, R.** 2013. Abscisic acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* 11, e0166.
- **Fischer AM.** 2012. The complex regulation of senescence. *Critical Review of Plant Science* 31, 124–147.
- **Flowers TJ, Yeo, AR.** 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. Journal Plant Physiology*. **22**: 875-84.
- **Fray RG, Wallace A, Grierson D, Lycett GW.** 1994. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Molecular Biology* 24: 539–543.
- **Fu L, Ding Z, Han B, Hu W, Li Y, Zhang J.** 2016. Physiological investigation and transcriptome analysis of polyethylene Glycol (PEG)-induced dehydration stress in Cassava. *International Journal of Molecular Science*. 25;17(3).
- **Fu X, Fu N, Guo S, et al.** 2009. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics* 10:161.

- **Galmes J, Ochogavía J, Gago J, Roldán EJ, Cifre J, Conesa MÀ.** 2013. Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, cell & environment* **36**, 920-935.
- **García-Martínez S, Andreani L, García-Gusano M, Geuna F, Ruiz JJ.** 2006. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome* **49**, 648–656.
- **George SG, Venkataraman A, Parida.** 2010. A chloroplast-localized and auxin-induced glutathione S-transferase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confer drought tolerance on tobacco, *Journal of Plant Physiology*. 167 311e318.
- **Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF.** 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* **54**; 767-781
- **Gong P, Zhang J, Li H, et al.** 2010. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of experimental botany* **61**, 3563-3575.
- **Graeve K, von Schaewen A, Scheibe R.** 1994. Purification, characterisation, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal* **5**, 353-361.
- **Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE.** 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology* **15**: 11-26
- **Hanson B, May D.** 2004. Effect of subsurface drip irrigation on processing tomato yield, water table depth, soil salinity, and profitability. *Agriculture Water Manage.* **68**: 1–17.
- **Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A.** 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* **154**, 1254-1271.

- **He F, Liu Q, Zheng L, Cui Y, Shen Z, Zheng L.** 2015. RNA-Seq Analysis of Rice Roots Reveals the Involvement of Post-Transcriptional Regulation in Response to Cadmium Stress. *Frontiers in Plants Science* 21;6:1
- **Higashide T, Narukawa M, Shimada Y, Soeno K.** 2014. Suppression of elongation and growth of tomato seedlings by auxin biosynthesis inhibitors and modeling of the growth and environmental response. *Scientific Report* 2; 4:4556.
- **Hong MJ, Kim DY, Lee TG, Jeon WB, Seo YW.** 2010. Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (PMEI) in wheat. *Genes & Genetic System.* 85(2):97-106.
- **Hou FY, Hueng J, Lu JF, Wang ZF, Zhang HS.** 2006. Isolation and expression analysis of plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica* 33, 441-448.
- **Houde M, Dallaire S, N'Dong D, Sarhan F** 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol Journal* 2:381–387
- **Huang L, Zhang F, Zhang F, Wang W, Zhou Y, Fu B, Li Z.** 2014. Comparative transcriptome sequencing of tolerant rice introgression line and its parents in response to drought stress. *BMC Genomics* 15, 1026
- **Hundertmark M, Hincha DK.** 2007. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 4;9:118
- **Hutchings D, Rawsthorne S, Emes MJ.** 2005. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oil seed rape (*Brassica napus*). *Journal of Experimental Botany* 56, 577-585
- **Ingram J, Bartels D.** 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review in Plant Physiol. and Plant Molecular Biology* 47: 377-404.

- **Iovieno P, Punzo P, Guida G, Mistretta C, Nurcato R, Bostan H, Colantuono C, Costa A, Bagnaresi P, Chiusano ML, Albrizio R, Giorio P, Batelli G, Grillo S.** 2016. An integrated analysis of responses to progressive Drought stress and rehydration in tomato. *Frontiers in plant science*. *Frontiers in plant science*.
- **Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki, M, Kato, T, Tabata, S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. *27*, 325–333.
- **Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H.** 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* *54*, 713–725.
- **Jiang Q, Ma R, Wang J, et al.** 2015. LncRNA Function: a comprehensive resource for functional investigation of human lncRNAs based on RNA-seq data. *BMC Genomics* *16*, 1–12.
- **Jones HG, Corlett JE.** 1992. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science* *119*, 291–296.
- **Keller CP, Stahlberg R, Barkawi LS, Cohen JD.** 2004. Long-term inhibition by auxin of leaf blade expansion in bean and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* *134*, 1217–1226.
- **Knight H, Trewavas AJ, Knight M.** 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* *12*:1067–1078.
- **Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J.** 2011. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, *74*, 1301–1322.
- **Krannich C, Malesky L, Kurowsky C, Horn R.** 2015. Network Candidate Genes in Breeding for Drought Tolerant Crops. *International Journal of Molecular Sciences* *16*, 16378-16400.

- **Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF. 2002.** Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141.
- **Kruger NJ, von Schaewen A. 2003.** The pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 236-246.
- **Leone A, Costa A, Consiglio F, Massarelli I, Dragonetti E, De Palma M, Grillo S. 1999.** Tolerance to abiotic stresses in potato plants: a molecular approach. *Potato Research* 42:333-350.
- **Lee, HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I, Kim WT. 2009.** Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* 21, 622–641.
- **Ledford H. 2008.** The death of microarrays? *Nature* 455:847.
- **Leterrier M, del Rio LA and Corpas FJ. 2007.** Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. *Free Radical Research* 41, 191-199.
- **Li KQ, Xu XY, Huang XS. 2016.** Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant Pear (*Pyrus betulaefolia*) as through RNA-Seq. *PLoS One*. 22;11(2).
- **Liao Y, Smyth GK and Shi W. 2014.** featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923-30.
- **Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B. 2000.** The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *The Plant cell* 12, 419–431.
- **Liu J, Wang X, Hu W, Hu, Bi Y. 2013.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots. *Plant Cell Reports* 32:415–429.

- **Liu H, Ma Y, Chen N, Guo S, Liu H, Guo X, Chong K, Xu Y.** 2014. Overexpression of stress-inducible OsBURP16, the β subunit of polygalacturonase 1, decrease pectin content and cell adhesion and increase abiotic stress sensitivity in rice. *Plant Cell & Environment* 37(5):1144-58.
- **Liu SC, Jin JQ, Ma JQ, Yao MZ, Ma CL, Li CF, Ding ZT, Chen L.** 2016. Transcriptomic Analysis of Tea Plant Responding to Drought Stress and Recovery. *PLoS One.* 20;11(1).
- **Liu Y, Zheng Y.** 2005. PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 331:325–332.
- **Liu Y, Zheng Y, Zhang Y, Wang W, Li R.**2010. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Current Microbiology* 60:373–378.
- **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25.
- **Lobell DB, Roberts MJ, Schlenker W, Braun N, Little BB, Rejesus RM, Hammer GL.** 2014. Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. *Science* 344: 516–519.
- **Loukehaich R, Wang T, Ouyang B, Ziaf K, Li H, Zhang J, Lu Y, Ye Z.** 2012. SpUSP, an annexin interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal of Experimental Botany* 63(15):5593-606.
- **Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369:242-245.
- **Magalhães AP, Verde N, Reis F, Martins I, Costa D, Lino-Neto T, Castro PH, Tavares RM, Azevedo H.** 2016. RNA-Seq and Gene Network Analysis Uncover Activation of an ABA-Dependent Signalosome During the CorkOak Root Response to Drought. *Frontiers in plants science.*

- **Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M.** 2008. Drought stress alters water relations and expression of *PIP*-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiology*. 49, 801–813.
- **Maldonado Dos Santos JV, Valliyodan B, Joshi T, Khan SM, Liu Y, Wang J, Vuong TD, Oliveira MF, Marcelino-Guimarães FC, Xu D, Nguyen HT, Abdelnoor RV.** 2016. Evaluation of genetic variation among Brazilian soybean cultivars through genome resequencing. *BMC Genomics*. 13;17(1):110.
- **Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, Nakayama TJ, Ribeiro Reis R, Bouças Farias JR, Harmon FG, Correa Molinari HB, Correa Molinari MD, Nepomuceno A.** 2015. Transcriptome wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the Day. *PLoS One* 10 (9).
- **Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB.** 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 53(377):2115-9.
- **Maurel C, Chrispeels MJ.** 2001. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*., 125:135–138.
- **McCarthy M, Loveys B, Dry P, Stoll M.** 2002. Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. *FAO Water Reports* 22, 79–87.
- **Mehrotra R, Bhalothia P, Bansal P, Basantani MK, Bharti V, Mehrotra S.** 2014. Abscisic acid and abiotic stress tolerance - Different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology* 171, 486-496.
- **Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M.** 2013. Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*. 18, 259–266.
- **Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K.** 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnology* 15:15-19.

- **Nemoto Y, Sasakuma T.** 2000. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 158, 53-60.
- **Nguyen HT, Babu RC, Blum A.** 1997. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science*. 37: 1426–1434.
- **Nicot N.** 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56, 2907–2914.
- **Nowrousian M.** 2010. Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot Cell* 9:1300-1310.
- **Nuruddin M, Madramootoo CA, Dodds GT.** 2003. Effects of Water Stress at Different Growth Stages on Greenhouse Tomato Yield and Quality. *Horticultural Science* 38, 1389–1393.
- **Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A.** 2001. Influence of water deficits on grape berry growth. *Vitis* 40, 141–145.
- **Park HY, Seok HY, Park BK, Kim SH, Goh CH, Lee BH, Lee CH, Moon YH.** 2008. Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 375.
- **Pedrosa AM, Martins Cde P, Gonçalves LP, Costa MG.** 2015. Late Embryogenesis Abundant (LEA) constitutes a large and diverse family of proteins involved in development and abiotic stress response in sweet orange *Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS One*. 23;10(12).
- **Peleg Z, Blumwald E.** 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 290–295.
- **Pinheiro C, Chaves MM.** 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* 62, 869–882.

- **Prudent M, Bertin N, Genard M, Munos S, Rolland S, Garcia V, Petit J, Baldet P, Rothan C, Causse M.** 2010. Genotype-dependent response to carbon availability in growing tomato fruit. *Plant, Cell and Environment* 33, 1186–1204.
- **Rai GK, Rai NP, Rathaur S, Kumar S, Singh M.** 2013. Expression of rd29A::AtDREB1A/CBF3 in tomato alleviates drought-induced oxidative stress by regulating key enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Plant Physiology and Biochemistry* 69, 90–100.
- **Rau A, Gallopin M, Celeux G and Jaffrezic F.** 2013. Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics*, 29(17), pp. 2146-2152.
- **Reynolds M, Tuberosa R.** 2008. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 171-179.
- **Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D, Shiratake K.** 2013. Genome wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS One*. 19;8(11): e79052.
- **Ribaut JM, Jiang C, Gonzalez-de-Leon D, Edmeades G, Hoisington DA.** 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize.2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theoretical and Applied Genetics* 94:887-896.
- **Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidel LP, Bertin N.** 2014. Water shortage and quality of fleshy fruits--making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* 65, 4097-117.
- **Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK.** 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26.
- **Rudich JE, Zamski Y, Regev.** 1977. Genotype variation for sensitivity to high temperature in the tomato: pollination and fruit set. *Botanical Gazette*. 138 (4):448-452

- **Sacco A, Ruggieri V, Parisi M, Festa G, Rigano MM, Picarella ME, Mazzucato A, Barone A.** 2015. Exploring a Tomato Landraces Collection for Fruit-Related Traits by the Aid of a High-Throughput Genomic Platform. *PlosOne*, 10 (9).
- **Scandalios JG.** 1997. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radicals Biology and Medical* 23:471-472.
- **Schmidt A, Forne I, Imhof A.** 2014. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC System Biology* 8 Suppl. 2:S3.
- **Seki M, Satou M, Sakurai T, Akiyama K, Iida K, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Narusaka M, Fujita M, Oono Y, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2004. RIKEN Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 55:213-223.
- **Sharma S, Villamor JG, Verslues PE.** 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology* 157, 292–304.
- **Sharp RE.** 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell & Environment* 25: 211–222.
- **Shigeoka S.** 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305-1319.
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417.
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221–227.

- **Silveira RD, Abreu FR, Mamidi S, McClean PE, Vianello RP, Lanna AC, Carneiro NP, Brondani C.** 2015. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). *Genetics and Molecular Research*. 3 81-200.
- **Singh A, Jha SK, Bagri J, Pandey GK.** 2015. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 10, e0125168.
- **Singleton VL, Rossi JA.** 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144–158.
- **Siracusa L, Patanè C, Avola G, Ruberto G.** 2012. Polyphenols as chemotaxonomic markers in Italian "long-storage" tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (1):309-14.
- **Siracusa L, Avola G, Patanè C, Riggi E, Ruberto G.** 2013. Re-evaluation of traditional Mediterranean foods. The local landraces of 'Cipolla di Giarratana' (*Allium cepa* L.) and long-storage tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): quality traits and polyphenol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (14):3512-9.
- **Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD, Qu R.** 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science*, 155:1-9.
- **Smirnoff N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27–58.
- **Sruthy MA, Cherian AV, Syamaladevi DP, Subramonian N.** 2015. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) Acts as a Key Regulator in the Formation of Anisotropic Interdigitation in Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) in Response to Drought Stress. *Plant and Cell Physiology* 56, 2368-80.
- **Stone SL.** 2014. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Frontiers in plants science* 5: 135.

- **Svensson J, Palva ET, Welin B.** 2000. Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* 20:169–178.
- **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 2725–2729.
- **Tanksley SD, McCouch SR.** 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277, 1063–1066.
- **Tanksley SD.** 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*. **16**: (1) S181–S189
- **Tenhaken R.** 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 7 ;5:771.
- **Thimm O, Blaesing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M.** 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal* 37(6):914-39.
- **Thomas H, Howarth CJ.** 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51, 329–337.
- **Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A, Taylor IB.** 2000. Abscisic acid biosynthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 42, 833-845.
- **Tomato genome consortium.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641.
- **Tunnacliffe A, Wise MJ.** 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 94(10): 791-812.

- **Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K.** 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 11:1743-1754.
- **Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del rio LA and Barroso JB.** 2006. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell and Environment* 29, 1449-1459.
- **Van Verk MC, Hickman R, Pieterse CM, Van Wees SC.** 2013. RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends in Plant Science* 18:175-9
- **Varshney RK, Singh VK, Hickey JM, Xun X, Marshall DF, Wang J, Edwards D, Ribaut JM.** 2015. Analytical and Decision Support Tools for Genomics-Assisted Breeding. *Trends in Plants Science* S1360-1385(15)00277-0.
- **Villalta I, Reina-Sanchez A, Bolarin MC, Cuartero J, Belver A, Venema K, Carbonell EA, Asins MJ.** 2008. Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 116:869–880.
- **Vinocur B, Altman A.** 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123-132
- **von Schaewen A, Langenkamper G, Graeve K, Wenderoth I, Scheibe R.** 1995. Molecular characterisation of the plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato in comparison to its cytosolic counterpart. *Plant Physiology* 109, 1327-1335.
- **von Caemmerer S, Farquhar GD.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387.
- **Wakao S, Benning C.** 2005. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41, 243-256.
- **Wallace JS.** 2000 Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agricultural Ecosystems and Environment* 82: 105–119

- **Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al.** 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470–6.
- **Wang Q, Eneji AE, Kong X, Wang K, Dong H.** 2015. Salt Stress Effects on Secondary Metabolites of Cotton in Relation to Gene Expression Responsible for Aphid Development. *PLoS One* 10(6):e0129541.
- **Wang W, Vinocur B, Altman A.** 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- **Wang X, Ma, Y, Huang C, Wan Q, Li N, Bi Y.** 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. *Planta* 227, 611-623.
- **Wendt UK, Wenderoth I, Tegeler A, von Schaewen A.** 2000. Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* 23, 723-733.
- **Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, et al.** 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453:1239–43.
- **Wise MJ, Tunnacliffe A.** 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9:13–17.
- **Xiong L, Zhu JK.** 2003. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*. 133(1): 29–36.
- **Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-HD, Wu R.** 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110:249–257.
- **Xu Y, Hu W, Liu J, Zhang J, Jia C, Miao H, Xu B, Jin Z.** 2014. A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biology*. 14, 59.

- **Yang Z, Wu Y, Li HQ, Ling C, Chu.** 2009. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice, *Plant Molecular Biology* 70 219e229.
- **Young TE, Meeley RB, Gallie DR.** 2004. ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant Journal* 40: 813–825.
- **Zegbe JA, Behboudian MH, Lang A, Clothier BE.** 2003. Deficit irrigation and partial rootzone drying maintain fruit dry mass and enhance fruit quality in Petopride processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Scientia Horticulturae* 98: 505–510.
- **Zhang N, Si HJ, Wen G, Du HH, Liu BL, Wang D.** 2011. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with BADH gene from spinach. *Plant Biotechnology Reports*. 5, 71–77.
- **Zhang JY, Cruz De Carvalho MH, Torres-Jerez I, Kang Y, Allen SN, Huhman D V, Tang Y, Murray J, Sumner LW, Udvardi MK.** 2014. Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell & Environment* 37, 2553–2576
- **Zhao P, Zhang L, Zhao L.** 2015. Dissection of the style's response to pollination using transcriptome profiling in self-compatible (*Solanum pimpinellifolium*) and self-incompatible (*Solanum chilense*) tomato species. *BMC Plant Biology*. 15:119
- **Zhong S, Fei Z, Chen YR, Zheng Y, Huang M, Vrebalov J, McQuinn R, Gapper N, Liu B, Xiang J, Shao Y, Giovannoni JJ.** 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology* 2: 154-9.
- **Zhu JK.** 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews in Plant Biology*, 53: 247-273.
- **Zhu JK.** 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinions in Plant Biology* 6:441-445.

CAPITOLO 6: RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro di dottorato è stato realizzato con il supporto finanziario dei seguenti progetti:

- Progetto MIUR-PON GENOPOMpro (PON02_00395_3082360).
- Progetto POR Campania FSE 2007–2013, CARINA.
- Progetto MEF -Legge n.191/2009, CISIA.

Si ringraziano della collaborazione per l'ottenimento di alcuni risultati sperimentali e l'analisi dei dati:

- I Dottori Pasquale Giorio, Rossella Albrizio e Gianpiero Guida del CNR-ISAFOM di Ercolano.
- Le Dottoresse Filomena Nazzaro e Florinda Fratianni del CNR-ISA di Avellino.
- I Dottori Walter Sanseverino e Riccardo Aiese Cigliano della SEQUENTIA biotech di Barcellona.

Si ringrazia inoltre la Dottoressa Cristina Patanè del CNR- IVALSA, per aver reso disponibili per il lavoro sperimentale della tesi i semi di alcuni genotipi di pomodoro della sua collezione.

Ringrazio per il supporto tecnico, sperimentale e morale tutti i membri dei gruppi di ricerca della Dottoressa Stefania Grillo del CNR-IBBR di Portici e del Professore Sergio Esposito dell'Università degli studi di Napoli Federico II:

CNR-IBBR

Dottoressa Stefania Grillo

Dottor Antonello Costa

Dottoressa Giorgia Batelli

Dottor Vincenzo Aurilia (CNR-ISAFOM, Ercolano)

Dottoressa Alessandra Ruggiero

Dottoressa Roberta Nurcato

Dottoressa Paola Punzo

Università Federico II

Professore Sergio Esposito

Dottoressa Alessia De Lillo

Dottor Marco Lentini