
**Strumenti di genomica funzionale
per l'identificazione e la
caratterizzazione del gene *rgga*
nella risposta allo stress idrico in
patata ed *Arabidopsis*.**

Alfredo Ambrosone

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXI ciclo
Indirizzo Biotecnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II





**Strumenti di genomica funzionale
per l'identificazione e la
caratterizzazione del gene *rgga*
nella risposta allo stress idrico in
patata ed *Arabidopsis*.**

Alfredo Ambrosone

Dottorando:	Alfredo Ambrosone
Relatore:	Prof. Luigi Monti
Co-relatore:	Dott.ssa Stefania Grillo
Coordinatore:	Prof. Giovanni Sannia

A mio nonno Nicola

INDICE

.....	- 1 -
RIASSUNTO	- 1 -
SUMMARY	- 3 -
1 INTRODUZIONE	- 6 -
1.1 Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress idrico	- 7 -
1.2 Geni coinvolti nella risposta a stress osmotici	- 8 -
1.2.1 Geni Funzionali	- 8 -
1.2.2 Geni Regolatori	- 10 -
1.2.3 Ottenimento di genotipi tolleranti gli stress ambientali mediante tecniche di ingegneria genetica	- 11 -
1.3 Analisi genomica della risposta delle piante agli stress ambientali	- 14 -
1.3.1 Analisi del trascrittoma mediante la tecnologia dei microarray	- 14 -
1.3.2 Analisi genomica funzionale: strategie di forward e reverse genetics per l'assegnazione di funzioni geniche	- 16 -
1.4 Scopo e contenuto della tesi	- 17 -
2 MATERIALI E METODI	- 19 -
2.1 Materiale vegetale	- 19 -
2.1.1 Colture cellulari e piante di <i>S. tuberosum</i>	- 19 -
2.1.2 Colture cellulari e piante di <i>A. thaliana</i>	- 19 -
2.1.3 Condizioni e trattamenti di stress	- 20 -
2.2 Estrazione di RNA totale	- 21 -
2.2.1 Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA	- 22 -
2.3 Studio di espressione genica	- 22 -
2.3.1 qRT-PCR e RT PCR	- 23 -
2.3.2 Northern blotting	- 23 -
2.4 Ottenimento e caratterizzazione di piante transgeniche di <i>A. thaliana</i>	- 25 -
2.4.1 Costruzione di vettori mediante tecnologia Gateway TM	- 25 -
2.4.2 Ottenimento di vettori shuttle	- 25 -
2.4.3 Ottenimento di vettori binari	- 26 -
2.4.4 Trasformazione genetica di <i>A. thaliana</i> mediata da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 27 -
2.4.5 Selezione di piante trasformate	- 27 -
2.4.6 Caratterizzazione di un mutante knockout di <i>A. thaliana</i>	- 29 -
2.5 Estrazione di proteine ed Analisi <i>Western blotting</i>	- 30 -
2.6 Analisi fenotipiche e fisiologiche	- 30 -
2.7 Saggio GUS	- 31 -
2.8 Analisi di localizzazione proteica	- 31 -
2.9 Analisi statistiche	- 32 -
2.10 Analisi bioinformatiche	- 32 -
3 RISULTATI	- 33 -
3.1 Studio del trascrittoma di patata in risposta a stress idrico	- 33 -

3.1.1	Validazione dei dati microarray e studio di espressione genica in cellule di <i>S. tuberosum</i>	- 36 -
3.1.2	Studio del profilo di espressione di geni coinvolti nello stress idrico in tessuti di patata	- 38 -
3.2	Caratterizzazione in silico ed isolamento del gene codificante per una RNA-binding in patata	- 40 -
3.3	Studio funzionale del gene <i>rgga</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 42 -
3.3.1	Analisi bioinformatica	- 42 -
3.3.2	Analisi di espressione in risposta a stress abiotici	- 43 -
3.3.3	Attività del promotore del gene <i>rgga</i>	- 45 -
3.3.4	Localizzazione della proteina di fusione RGGG::YFP	- 47 -
3.3.5	Produzione di piante transgeniche sovraesprimenti <i>rgga</i> e caratterizzazione molecolare di mutanti knockout	- 50 -
3.3.6	Caratterizzazione fenotipica del mutante knockout e delle piante transgeniche in risposta a stress	- 52 -
4	DISCUSSIONE	- 55 -
4.1	<i>Network</i> di geni coinvolti nella risposta allo stress idrico di breve e lunga durata	- 56 -
4.2	Identificazione di geni stress-responsive in piante di <i>S. tuberosum</i> -	60 -
4.3	Il gene <i>Rgga</i> (proteina <i>RNA-binding</i>) e il suo ruolo nei meccanismi di risposta a stress osmotici.....	- 61 -
5	MATERIALE SUPPLEMENTARE.....	- 67 -
6	BIBLIOGRAFIA.....	- 87 -
	APPENDICE.....	- 95 -
	RINGRAZIAMENTI.....	-97 -

RIASSUNTO

Il deficit idrico e la presenza di alte concentrazioni di sale nel suolo limitano enormemente la produttività di specie agrarie; si stima che circa il 28% dei suoli coltivabili non abbia una disponibilità adeguata di acqua per la produzione di specie di interesse.

La risposta delle piante a stress abiotici è un fenomeno complesso che coinvolge un ampio *network* di geni. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della risposta allo stress e, soprattutto, dell'adattamento a condizioni ambientali avverse è di fondamentale importanza per l'ottenimento di varietà delle maggiori specie vegetali che garantiscano stabilità di produzione anche in condizioni ambientali sub-ottimali e promuovendo, inoltre, lo sviluppo di un'agricoltura eco-sostenibile.

Il presente progetto di ricerca ha avuto come obiettivo l'identificazione e la caratterizzazione di geni la cui espressione è regolata in risposta a carenza idrica in patata (*Solanum tuberosum*). Allo scopo di identificare geni chiave nella risposta al deficit idrico a breve termine (condizioni di *shock*) e in quella a lungo termine (condizioni di adattamento), è stato effettuato, inizialmente, uno studio del trascrittoma di colture cellulari di patata in risposta a stress idrico, indotto da polietilene glicole (PEG 20%), attraverso un'analisi *microarray*. L'analisi dei dati *microarray* ha permesso l'identificazione di 1055 geni differenzialmente espressi di cui 130 e 337 geni sovraespressi nelle cellule stressate e adattate, rispettivamente.

Una dettagliata caratterizzazione dei profili di espressione in cellule di patata sottoposte a stress idrico è stata effettuata, inoltre, mediante *quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR). Lo studio di espressione condotto su un set di 25 geni selezionati ha permesso di confermare e validare i dati ottenuti mediante *microarray*. Inoltre, i geni selezionati sono risultati regolati da stress anche in foglie e radici provenienti da piante di patata sottoposte a prolungato deficit idrico, confermando il loro potenziale coinvolgimento nei meccanismi di graduale adattamento a condizioni di carenza idrica prolungata.

E' stato effettuato, quindi, un dettagliato studio molecolare e funzionale del gene codificante per una proteina *RNA-binding* (*rgga*), la cui espressione è risultata specificamente indotta durante condizioni di adattamento allo stress in cellule ed in piante di patata. La sequenza codificante del gene *rgga* di *S. tuberosum* è stata isolata e ulteriormente caratterizzata mediante un approccio bioinformatico, evidenziando elevata similitudine con proteine *RNA binding* di altre specie vegetali. Una più approfondita analisi di *rgga* è stata effettuata in *Arabidopsis thaliana*, l'organismo vegetale modello maggiormente caratterizzato e per il quale sono disponibili validi strumenti di analisi di genomica strutturale e funzionale. In particolare è stato evidenziato mediante qRT-PCR e *Northern blotting* che l'espressione del gene *rgga* è indotta in cellule di *Arabidopsis* in risposta ad alte concentrazioni di NaCl, PEG ed ABA (Acido Abscissico) e in giovani piantine sottoposte a stress osmotico di lunga durata.

L' espressione *in vivo* di *rgga* è stata studiata mediante localizzazione del gene *reporter* GUS clonato a valle del promotore del gene. Il saggio istochimico ha rivelato che *rgga* è espresso costitutivamente in piante di *Arabidopsis*; in particolare una forte attività di GUS è stata ritrovata nella radice, nei fasci vascolari, negli stomi e nel polline. L'analisi al microscopio confocale di piante transgeniche esprimenti la

proteina di fusione RGGG-YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), ha evidenziato una localizzazione prevalentemente citoplasmatica della proteina di interesse.

Al fine di comprendere i meccanismi di risposta e tolleranza in condizioni di carenza idrica, è stato condotto, inoltre, un approccio genetico di “*gain and loss of function*” mediante l’uso di mutanti *knockout* (*rgga ko*) e l’ottenimento di piante transgeniche di *Arabidopsis* sovraesprimenti *rgga* (*rgga202*). Le analisi fenotipiche e fisiologiche in condizioni controllo ed in condizioni di stress hanno evidenziato una scarsa capacità di germinazione nel mutante *knockout*, rispetto alle piante controllo, in presenza di 120 mM di NaCl. Piante *rgga202*, invece, sono risultate maggiormente tolleranti rispetto al controllo ed al *knockout* in condizioni di stress imposte da trattamenti con PEG e NaCl. I risultati ottenuti suggeriscono che *rgga* riveste un ruolo cruciale nella complessa risposta della pianta a stress osmotico e, in particolare, nei meccanismi cellulari coinvolti nell’adattamento e nella tolleranza.

SUMMARY

Drought is one of the major abiotic stresses affecting plant growth and reducing crop productivity being the 28% earth land represented by soils too dry for crop production. Agronomic amendments (irrigation, soil correction) might be still adopted to reduce the impact of drought stress on yield stability, but the additional costs for such modifications could be in many cases not economically advantageous. The increased occurrence of drought and its severity imposes to select new varieties able to sustain plant growth and productivity under unfavourable environmental conditions. Conventional breeding for drought resistance has been a basic approach for a long time and some successes have been achieved in several crops. However, a big gap remains between the current resistance levels and what is needed to guarantee yield stability for most of the major crops.

Drought stress response and/or tolerance is a complex trait and is the result of the coordination of biochemical and physiological changes at the cellular and molecular level, including stomatal closure, cell growth alterations and photosynthesis inhibition, aimed at limiting cellular damages and rescuing a new cellular homeostasis. Many of these changes involve a large number of genes, whose characterization has significantly contributed to the understanding of the complex response to stress signals. Many stress-induced genes are directly involved in activating tolerance /adaptation mechanisms, encoding polypeptides, with putative protective roles in the stressed cells, such as in ion transport (uptake, extrusion and sequestration of ions), membrane stabilization and chaperone functions, and small organic molecules, acting as osmoprotectants (proline, glycine betaine, sugars).

However plant ability to activate the appropriate response machinery and adapt to the adverse conditions depends also on intensity and duration of the stress signal. A short exposition to a severe osmotic stress can produce irreversible damages to cellular structures. Instead, a gradual imposition of water deficit may induce metabolic and molecular changes allowing a new homeostatic equilibrium that leads to plant stress tolerance. Gene networks and enzymatic processes involved in these processes are thought to be quite different.

In an attempt to discern stress-responsive genes that contribute to increase drought tolerance from those merely activated by a general stress response, an *ad hoc* experimental system based on a potato cell populations was previously developed at CNR-Institute of Plant Genetics, Portici. Potato (cv. Desirée) cells cultures exposed to a gradual increase in PolyEthyleneGlycole (PEG)-mediated low water potential (adapted cells) were compared systematically, at physiological and molecular to populations of cells subjected to abrupt intense water stress (shocked cells) (Leone et al, 1994a). Adaptation to water stress was found to be associated to several physiological and biochemical changes that include ability to sustain active cellular growth at conditions of water stress and salt conditions otherwise non permissive, accumulation of compatible osmoprotectants, such as proline, recovery of protein synthesis (Leone et al., 1994b), changes in gene expression of stress responsive genes (Costa et al., 2002; Ambrosone et al., 2006), higher membrane stability due to changes in membrane lipid composition (Leone et al., 1996).

In this frame, the Doctoral research project was aimed to use a multidisciplinary advanced approach to identify genes and genes functions specifically activated upon

short term and long term water stress and whose activation was correlated with the ability of sustain active growth in non-optimal environmental conditions.

To have a global view of the changes in gene expression during water stress and to compare the two different responses a microarray approach was used. Potato 10k cDNA array slides from TIGR (The Institute for Genomics Research) were challenged with RNA isolated from untreated, shocked and adapted cells. The use of this technology allowed the identification of a set of genes whose expression was differentially regulated in potato upon different stress conditions: in particular, 129 up-regulated genes and 415 down-regulated genes during PEG adaptation, and 337 up-regulated and 184 down-regulated genes in response to PEG water stress were identified. Among the up-regulated genes, only 15 genes (*aldo/keto reductase, lipase/hydrolase, lectin kinase, heat shock 81-2, DNA translocase, zinc finger del tipo DHHC and others*) were commonly regulated in shocked and adapted potato cells. Similarly, a limited number of common down-regulated genes, were identified in the two cell populations. Many of the identified genes highly expressed in the adapted potato cells belong to different functional classes, such as protein known to be involved in stress-response (e.g. heat shock proteins), involved in general cellular processes, e.g. protein synthesis, hormone metabolism, transcription and others. Data analysis confirms that different gene networks are mediating the short- and long-term cellular response to water stress. It is possible to speculate that genes up-regulated in shocked cells are early responsive and code for proteins providing initial protection and amplification of primary osmotic stress signals, while the genes whose expression is altered in adapted cells may code for proteins directly involved in the acquisition of the long term tolerance to stress conditions.

As already found in similar experiments for different crop species, about 40% of the stress-responsive genes, identified in potato cell populations, matched with sequences in data banks with no assigned biological function.

To validate microarray data in potato cells and to profile the expression of identified genes in adult plants in response to long term water-deficit, expression analysis of transcripts of about 25 genes of interest (including *catalase, sucrose synthase, heat shock protein 81-2, 14*3*3 protein, RNA-binding protein*) was performed by qRT-PCR. Results, beside validating the microarray data, showed that several genes were regulated similarly in potato plants exposed to drought and in cells cultures, thus confirming the utility of the experimental system used to identify stress-responsive genes of interest in plants and to characterize specific events occurring in response to different osmotic signals.

Among the genes consistently induced in response to water deficit the EST AW906734 coding for the potato homologous *sato2* gene of *Beta vulgaris*, was identified. Due to the interesting features of the putative protein and the gene expression profile upon stress a detailed characterization of the gene and its product was carried out using advanced bioinformatics and functional approaches.

To obtain more information about the gene in potato, the complete coding sequence was isolated by RT-PCR. Sequence analysis and BlastP search revealed that the translated protein is similar (more than 65% identity) to RGGGA, a glycin-rich RNA binding protein (GRP) with unknown function found in several species as *Beta vulgaris, Vicia faba, Spinacia olearia* and *Arabidopsis thaliana*. Despite the fact this family of RNA-binding proteins have been implicated in the responses of plants to environmental stresses, their physiological functions and action mechanisms in stress responses remain largely unknown.

To get further insight the functional role of RGGGA a multidisciplinary approach was performed in Arabidopsis, taking advantage of the different genomic tools available (extensive sequence and expression databases, mutant collections, etc) for this species.

A detailed bioinformatic analysis evidenced that the homologous RGGGA gene in Arabidopsis (*Atrgga*) codes for a glycine-rich RNA-binding protein of 355 aa containing a RGG box domain. Similarly to the potato gene, *Atrgga* expression resulted to be regulated in response to different exogenous treatments (ABA, NaCl, PEG) in both cell cultures and young plants as revealed by RT-PCR and Northern blot.

A functional approach based on a “gain and loss of function” strategy was then performed by developing overexpressing *rgga* transgenic plants and using knockout mutants from public collections. Comparative analyses of these genotypes with wild type plants in presence/absence of stress treatments revealed that the *rgga* overexpressing plants exhibited osmotic stress tolerance showing a higher plant survival in presence of NaCl and PEG; inversely seed germination and plant growth of *rgga* knockout mutant (*rgga ko*) were severely affected by ABA, high salt and osmotic stress.

To further characterize the expression *in vivo* of *rgga* gene in Arabidopsis vegetative and reproductive tissues, 1500 bp of *rgga* promoter sequence was fused to GUS gene. High GUS expression driven by *rgga* regulatory sequences was found in the guard cells and in vascular tissues.

Furthermore, to investigate the subcellular localization of the RGGGA, transgenic plants overexpressing YFP-RGGGA fusion protein were obtained. Fluorescence signal, obtained by confocal microscopy, revealed that RGGGA is localized in both the cytoplasm and perinuclear region, no evidence of protein accumulation was found in root meristematic cells.

The data taken together provide compelling evidence that RGGGA affects the growth and stress tolerance of Arabidopsis plants under high salt and drought stress conditions suggesting an important role in the complex machinery of plant adaptation to osmotic stress.

.

1 INTRODUZIONE

Condizioni di crescita non ottimali causate da stress biotici e abiotici limitano in modo decisivo la produttività delle piante d'interesse agrario. In particolare, condizioni di stress ambientali, quali inadatta disponibilità delle risorse idriche, carenza/eccesso di sali nel terreno, temperature al di sopra o di sotto di quelle ottimali, sono la maggiore causa di perdita economica e d'instabilità delle produzioni agricole (Flowers e Yeo; 1995, Bray et al. 2000).

E' stato evidenziato che solo il 10% dei terreni coltivati nel mondo permette condizioni di crescita ideali e che 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). Inoltre, le modificazioni delle risorse naturali della terra causate dai problemi d'antropizzazione e industrializzazione di vaste aree del pianeta (declino della fertilità del suolo, innalzamento della temperatura terrestre, desertificazione d'ampie aree del globo) stanno avendo un impatto significativo sulle condizioni ambientali del pianeta. Le conseguenze di tali modificazioni sulle produzioni agricole e sulla qualità e la salute dell'ambiente non sono più ignorabili.

Misure per migliorare la produttività delle piante agrarie e mitigare gli effetti negativi di stress ambientali richiedono azioni integrate di discipline diverse (economia, agronomia, genetica, miglioramento genetico, biologia molecolare). Lo sviluppo di nuovi sistemi produttivi concepiti dalle moderne tecnologie agronomiche può dare un valido contributo per la gestione razionale ed efficiente di aree agricole marginali, caratterizzate da condizioni di coltivazione sub-ottimali, qualora vi sia un efficace intervento economico e politico.

Il miglioramento genetico tradizionale, basato sull'utilizzazione della variabilità genetica esistente, dell'ibridazione interspecifica e intergenerica, delle mutazioni indotte e della variabilità somaclonale, ha avuto un limitato successo nell'ottenimento di piante resistenti o tolleranti a stress ambientali (Flowers & Yeo, 1995). Questo è dovuto principalmente alla complessità dei caratteri capaci di indurre tolleranza allo stress, alla bassa variabilità genetica delle componenti legati alla produzione in condizioni di stress ambientali e alla mancanza di efficienti tecniche di selezione (Ribaut *et al.*, 1997).

Tuttavia, lo sviluppo di conoscenze prodotte dalle applicazioni di tecnologie di genetica molecolare e genomica sta consentendo la definizione delle basi molecolari della risposta delle piante a condizioni di stress e l'identificazione di geni con ruolo chiave nei meccanismi adattativi. Tali avanzamenti permettono oggi di avere un quadro più chiaro delle funzioni genetiche importanti in tali processi e consentono di sviluppare strategie mirate per la selezione di nuovi genotipi adatti alla coltivazione e alla produzione in condizioni ambientali sub-ottimali.

Nei successivi paragrafi è delineato lo stato delle conoscenze sulla complessità della risposta delle piante a stress osmotici, con particolare riferimento allo stress idrico, e sono riportati gli approcci utilizzati e gli esempi di successo per l'identificazione di funzioni geniche chiave e l'ottenimento di nuovi genotipi tolleranti.

1.1 Meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari della risposta allo stress idrico

Le piante, in quanto organismi sessili, incapaci di sfuggire alle condizioni ambientali avverse, hanno sviluppato un'ampia varietà di strategie per adattarsi alle mutevoli condizioni ambientali. Le cellule vegetali hanno, di conseguenza, evoluto *pathway* di segnalazione per percepire ed integrare differenti segnali dall'ambiente e rispondere modulando l'espressione dei geni appropriati (Knight e Knight, 2001). Le risposte fisiologiche delle piante coltivate allo stress idrico sono particolarmente complesse e, generalmente, causano una riduzione della crescita ed un calo della produttività. La carenza idrica a livello citologico determina una disidratazione cellulare, che causa concentrazione dei soluti, cambiamenti nel volume della cellula e nella forma del plasmalemma, diminuzione del gradiente idrico interno, perdita del turgore e dell'integrità di membrana e, infine, denaturazione proteica (Ingram e Bartels, 1996). La tolleranza allo stress idrico è quindi il risultato del coordinamento di alterazioni biochimiche e fisiologiche a livello cellulare e molecolare, come la sintesi di acido abscissico (ABA), l'accumulo di vari osmoliti e di proteine con un ruolo di riparazione e protezione in sinergia con un efficiente sistema antiossidante (Cushman e Bonhert, 2000).

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

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

Negli ultimi anni, diversi approcci sperimentali hanno portato all'identificazione e descrizione di un enorme numero di geni e funzioni geniche coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante a stress idrico e allo stress osmotico ad esso associato (per recenti *review* consultare Bohnert et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). L'analisi su larga scala del trascrittoma ha, infatti, evidenziato che centinaia di geni sono attivati o repressi in risposta a stress idrico ed osmotico (Bray, 2004; Seki et al., 2004). I diversi geni individuati, oltre ad avere un ruolo diretto nella protezione delle cellule dai danni causati da stress osmotico, sono coinvolti nell'attivazione di circuiti di regolazione che controllano l'intero *network* della risposta a carenza idrica. I geni coinvolti sono, quindi, generalmente divisi in due categorie: i) GENI FUNZIONALI, che includono geni implicati nella sintesi di molecole e proteine con ruolo protettivo di

processi cellulari cruciali (proteine protettive, enzimi detossificanti, osmoliti compatibili ed altri), isolati da piante e organismi procariotici, e ii) GENI REGOLATORI, codificanti proteine regolatrici coinvolte nella percezione e trasduzione del segnale di stress (putativi recettori, calmoduline, *calcium-binding proteins*, fosfolipasi, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione), che modulano l'espressione dei geni appartenenti alla prima categoria (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Leone et al., 1999).

1.2 Geni coinvolti nella risposta a stress osmotici

1.2.1 Geni Funzionali

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

GENI COINVOLTI NELLA OSMOREGOLAZIONE CELLULARE - In condizioni di carenza idrica, le cellule accumulano soluti per aumentare la pressione osmotica intracellulare, evitare la perdita di acqua e mantenere il turgore cellulare. Tali soluti includono ioni come K^+ , Na^+ e soluti organici, quali composti dell'ammonio quaternario (glicinetaina), amminoacidi (prolina), polioli (inositolo, mannitolo) e zuccheri (saccarosio, trealosio), chiamati anche osmoliti compatibili perché si accumulano in quantità elevate nel citoplasma non interferendo con le normali funzioni cellulari. Geni codificanti per enzimi coinvolti nella biosintesi degli osmoliti sono stati isolati da diverse specie vegetali e micro-organismi, che condividono con le piante alcuni meccanismi osmoprotettivi. Negli ultimi anni la manipolazione dei livelli di osmoliti mediante approcci di ingegneria genetica è stata oggetto di numerose ricerche, i cui risultati principali sono riportati nel paragrafo 1.3.3 e in recenti articoli (Wang et al., 2003; Vinocur e Altman, 2005; Umezawa et al., 2006; Valliyodan e Nguyen, 2006). Il meccanismo di protezione cellulare fornito dagli osmoliti è ancora dibattuto. Oltre al ruolo nell'aggiustamento osmotico, gli osmoliti (prolina e mannitolo) sembrano svolgere anche altre funzioni, come l'inattivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hong et al., 2000) o la stabilizzazione strutturale delle proteine (Carpenter et al., 1990).

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

Le acquaporine (*water channel proteins*) sono proteine canale che facilitano il passaggio dell'acqua attraverso le membrane, regolando la conduttività idraulica delle membrane (Maurel e Chrispeels, 2001). Molti geni codificanti per acquaporine sono sovraespressi in risposta a stress idrico, tra questi *rd28* in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992) e TRAMP (*tomato-ripening-associated membrane protein*) (Fray et al., 1994).

Il mantenimento dell'omeostasi ionica cellulare, mediante regolazione dell'assorbimento, del sequestro, della esclusione e del trasporto ionico in condizioni di stress è garantito dall'attività di trasportatori, che si accumulano in risposta a stress osmotico associato a carenza idrica. Grazie a questa regolazione, nella cellula

è prontamente ristabilito un rapporto equilibrato K^+/Na^+ e mantenuta una bassa concentrazione citosolica di Na^+ (Zhu, 2003). In particolare le piante, in condizioni di stress salino, allontanano lo ione Na^+ dal citosol attraverso meccanismi di esclusione o di compartimentalizzazione nel vacuolo. L' Na^+ , infatti, può essere secreto al di fuori della cellula attraverso proteine antiporto di cui la meglio caratterizzata è quella codificata dal gene *sos1* (Zhu, 2000). La proteina SOS1, la cui attività è indotta in condizioni di stress, è localizzata sulla membrana plasmatica, dove funziona da antiporto Na^+/H^+ (Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001).

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

PROTEZIONE DELLE STRUTTURE CELLULARI E RIPARO DEI DANNI. Durante lo stress, differenti prodotti genici si accumulano per proteggere le strutture cellulari e importanti funzioni metaboliche.

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

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

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

In particolare la catalasi è essenziale per rimuovere H_2O_2 prodotta nei perossisomi durante la fotorespirazione (Noctor e Foyer 2000).

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

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

1991). Da recenti studi è emerso che alcune HSP con una simile funzione sono indotte da stress idrico ed osmotico in tabacco e patata (Zhu et al., 1993; Costa et al., 2005).

1.2.2 Geni Regolatori

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

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

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

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

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

trasmissione intracellulare del segnale di stress idrico e sulle interconnessioni con altri tipi di stress.

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

Un altro *pathway* di segnalazione ABA-dipendente coinvolge fattori trascrizionali di tipo Myb (*AtMYB2*) e Myc (*AtMYC2*), la cui sintesi dipende dall'accumulo di ABA e la cui azione è quindi più tardiva rispetto ai fattori ABF. Similmente ai fattori ABF, la loro sovra-espressione costitutiva in piante transgeniche induce ipersensibilità all'ABA e migliorata tolleranza a stress (Abe et al., 2003). Geni attivati da tali fattori trascrizionali sono *Rd22* ed altri geni coinvolti nello stress idrico, ABA-dipendenti, ma anche l'alcol deidrogenasi e geni regolati dall'acido jasmonico (Abe et al., 2003).

REGULONI ABA-INDIPENDENTI – Il *pathway* di regolazione che coinvolge i fattori DREB/CBF costituisce il più importante regulone ABA-indipendente identificato in *A. thaliana*, sia per il numero di geni a valle coinvolti, sia per gli effetti della sua sovra-espressione in piante transgeniche in termini di tolleranza agli stress (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Nei promotori di diversi geni la cui espressione è indotta da carenza idrica, ma anche da temperature al di sotto di 0°C, è presente un elemento DRE/CRT (*Drought Responsive Element/C Repeat*) con sequenza consenso A/GCCGAC responsabile della risposta a stress ABA-indipendente (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994). Sono stati identificati diversi fattori trascrizionali (TF), appartenenti alla classe AP2 (Apetala2) in grado di legare elementi *cis*, raggruppabili nelle due classi DREB1 (*DRE Binding protein 1*) o CBF (*C-repeat Binding Factor*) e DREB2 (*DRE Binding protein 2*). In particolare, le proteine DREB2A e DREB2B sono coinvolte nell'espressione di geni indotti da carenza idrica (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

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

1.2.3 Ottenimento di genotipi tolleranti gli stress ambientali mediante tecniche di ingegneria genetica

La modificazione dell'espressione, in piante transgeniche, di molti dei geni identificati e descritti nei precedenti paragrafi è stato l'approccio più utilizzato per verificare il reale coinvolgimento dei diversi geni nei meccanismi di tolleranza e per poter definire la funzione biologica del prodotto genico, quando questa non era nota. Inoltre, strategie di ingegneria genetica sono state disegnate e sviluppate per

ottenere in modo mirato piante tolleranti con alterati livelli di osmoliti, attività di enzimi anti-ossidanti e/o con modificata espressione di fattori di trascrizione (Tab. 1).

Prodotto	Gene	Origine	Ospite	Referenza
<u>Metabolismo osmoliti</u>				
Fruttano	<i>SacB</i>	<i>B. subtilis</i>	Tabacco, barbabietola	Pilon -Smits et al., 1995, 1999
Trealosio	<i>Tps1</i>	Lievito	Tabacco	Romero et al., 1997
Poliammine	<i>ADC</i>	<i>D. stramonium</i>	Riso	Capell et al., 2004
Prolina	<i>P5CS</i>	Arabidopsis	Petunia	Yamada et al., 2005
PROTEINE PROTETTIVE				
LEA	<i>HVA1</i>	Orzo	Riso	Xu et al., 1996
Chaperone	<i>Bip</i>	Soia	Tabacco	Alvim et al., 2001
LEA	<i>LLA23</i>	<u>Lilium</u>	Arabidopsis	Yang et al., 2005
<u>Enzimi Detossificanti</u>				
Perossidasi	<i>APX3</i>	Arabidopsis	Tabacco	Yan et al., 2003
Superossido dismutasi	<i>Mn-SOD</i>	Tabacco	Alfalfa	McKersie et al., 1996
<u>Fattori Trascrizionali</u>				
DREB1/CBF	<i>ZmBREB1A</i>	Mais	Arabidopsis	Qin et al., 2004
DREB1/CBF	<i>DREB1A</i> <i>/CBF3</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Kasuga et al., 1999
AP2/ERF	<i>SHN1/WIN1</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Aharoni et al., 2004
bZip	<i>ABF3</i>	Arabidopsis	Riso	Oh et al., 2005
MYB	<i>CpMYB10</i>	<i>C. plantagineum</i>	Arabidopsis	Villalobos et al., 2004
<u>Fattori di Segnale di stress</u>				
MAPKKK chinasi	<i>NKP1</i>	Tabacco	Mais	Shou et al., 2004
Farnesyl transferase	<i>ERA1</i>	Arabidopsis	Colza	Wang et al., 2005
<u>Altro</u>				
Pompa ionica H ⁺	<i>AVP1</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Gaxiola et al., 2001
Enzima malico (apertura stomatica)	<i>Chi-NADP</i> <i>-Me</i>	Tabacco	Tabacco	Laporte et al., 2002
Expoxi-dioxigenasi (Biosintesi ABA)	<i>AtNCED3</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Iuchi et al., 2001

Tabella 1. Esempi di piante transgeniche tolleranti a condizioni di stress da carenza idrica ottenute mediante sovraespressione di geni appartenenti a diverse categorie funzionali.

Nell'ultimo decennio piante transgeniche parzialmente tolleranti a stress osmotici sono state ottenute sia in sistemi modello (tabacco e *Arabidopsis*) sia in piante di interesse agrario, utilizzando geni di origine batterica o vegetale codificanti per enzimi della catena biosintetica di molecole a funzione protettiva o osmoregolativa quali mannitolo, trealosio, prolina, glicinbetaina (Tarczynski et al., 1993; Kavi Kishor et al., 1995; Lilius et al., 1996; Romero et al., 1997).

Piante transgeniche di *Arabidopsis* sovra-esprimenti i geni glicina-sarcosina metiltransferasi e dimetilglicina-metiltransferasi, coinvolti nella sintesi delle betaine utilizzando il *pathway* a partire dalla glicina, accumulano elevati livelli di glicinbetaina e sono maggiormente tolleranti in condizioni di carenza idrica rispetto a piante in cui la glicinbetaina è prodotta attraverso il *pathway* mediato dalla colina (Waditee et al., 2005). Il meccanismo attraverso il quale gli osmoliti inducono protezione non è completamente chiaro, infatti, le piante "ingegnerizzate" accumulano livelli bassi di osmoliti e tali da non poter avere un ruolo primario nei meccanismi di aggiustamento osmotico, ma probabilmente possono cooperare con altre componenti per ridurre i radicali liberi che si accumulano in risposta a stress ossidativi indotti da eccessi di disidratazione cellulare (Shen et al., 1997). In tale contesto, una strategia già percorsa per ottenere piante tolleranti si è basata sulla manipolazione dei livelli di enzimi anti-ossidanti in piante transgeniche. Diversi gruppi di ricerca hanno ingegnerizzato piante con geni codificanti per enzimi anti ossidanti (superossido-dismutasi, glutatione-S-transferasi, catalasi) la cui espressione è indotta da carenza idrica e la cui attività conferisce alle piante protezione parziale dai danni di tipo ossidativo (Mittler, 2002).

Altri geni *target* per approcci di ingegneria genetica sono stati i geni codificanti proteine che si accumulano notevolmente in risposta a disidratazione come la classe di proteine LEA che, come riportato nel paragrafo 2.1, hanno una funzione di riduzione dei danni da stress e di protezione delle strutture cellulari. La sovra-espressione in tabacco di alcuni membri della famiglia LEA di *Craterostigma plantagineum* non ha prodotto fenotipi tolleranti (Iturriaga et al., 1992), mentre l'accumulo in riso e grano del gene LEA *hva1* di orzo ha indotto tolleranza a stress idrico (Xu et al., 1996; Sivamani et al., 2000).

I risultati sin qui ottenuti, mediante sovra-espressione di singoli geni, indicano chiaramente che questa strategia può permettere solo limitati miglioramenti della tolleranza agli stress, molto spesso limitata alle condizioni sperimentali (durata e intensità dello stress) utilizzate, che sono molto differenti dalle condizioni reali di coltivazione in pieno campo. Appare chiaro, infatti, che la risposta della pianta agli stress è un fenomeno molto complesso, che richiede l'azione concertata di numerose funzioni geniche e che quindi la sovra-espressione di un singolo gene può solo marginalmente migliorare le *performance* produttive in condizioni di carenza idrica.

Una strategia recentemente utilizzata, anche in base alle recenti acquisizioni sui meccanismi di trasduzione del segnale di stress a livello intracellulare, è stata quella di sovra-esprimere in piante transgeniche geni che sono a monte della complessa catena di eventi che va dalla percezione del segnale di stress alla sua trasmissione all'interno della cellula. Geni che codificano per chinasi, fosfatasi, sensori del calcio sono stati identificati e utilizzati in approcci di ingegneria genetica; i risultati più promettenti, sintetizzati da Boudsocq e Lauriere (2005) chiaramente indicano che la induzione/repressione in risposta a stress di componenti dei diversi *pathway* di trasduzione del segnale può essere utilizzata con successo per la manipolazione biotecnologica della risposta delle piante a stress multipli (Umezawa et al., 2006). In particolare la sovraespressione del fattore trascrizionale DREB1 in *Arabidopsis*

risulta in piante con aumentata tolleranza a freddo, temperature al di sotto di 0°C, elevati livelli di sale e stress idrico (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2004). L'operone DREB sembra estremamente conservato tra le specie, come suggerito sia dall'isolamento di geni DREB simili in diverse specie, sia dal fatto che la sovra-espressione di DREB di *Arabidopsis* in altre specie e viceversa, ne migliora la tolleranza a stress (Qin et al., 2004; Zang JZ et al., 2004; Zang X et al., 2004).

1.3 Analisi genomica della risposta delle piante agli stress ambientali

Dall'approccio *gene by gene*, sopra descritto nell'ultimo decennio le ricerche e gli studi sulla complessità dei meccanismi di risposta delle piante a stress ambientali e in ultima istanza, della tolleranza, 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. L'impiego di nuove tecnologie per il clonaggio dei geni e per il sequenziamento ad alto flusso ha portato allo sviluppo di nuove metodologie che sono capaci di sfruttare pienamente l'aumentata disponibilità di informazioni prodotte riguardo ai genomi.

Il sequenziamento di interi genomi o di *Expressed Sequence Tags* (EST) e il numero crescente di informazioni sui profili di espressione genica derivanti dall'uso esteso di tecniche di *array*, hanno consentito, infatti, di identificare centinaia di geni la cui espressione è indotta o variamente modulata in risposta a stress idrico (*drought-related genes*) (Bray, 2004; Bonhert et al., 2006). Tuttavia, questo tipo di informazioni non consente di conoscere l'effettivo ruolo ed, in ultima analisi, il significato adattativo di geni indotti da carenza idrica. Sono state sviluppate, quindi, negli ultimi anni, strategie genetiche funzionali, per definire, da una parte, la funzione dei geni isolati e dall'altra per isolare nuovi geni sulla base della loro specifica funzione nei meccanismi di tolleranza.

Nei prossimi paragrafi sono riportati gli approcci disponibili ed alcuni esempi dei risultati più significativi già ottenuti utilizzando diverse strategie su larga scala per a) lo studio della complessa regolazione dell'espressione genica in risposta a stress, b) l'identificazione di nuovi geni e c) lo studio della loro funzione nei meccanismi di risposta a stress idrico .

1.3.1 Analisi del trascrittoma mediante la tecnologia dei microarray

I *microarray*, rispetto ad altre tecnologie genomiche, offrono molti vantaggi per l'analisi dei profili di espressione, soprattutto perché consentono con un solo esperimento di monitorare i livelli d'espressione di centinaia o migliaia di sequenze espresse, che rappresentano una parte se non la totalità della capacità informativa di una cellula. I *microarray* si sono rivelati molto utili nell'identificazione di geni coinvolti in diverse condizioni di stress e nella definizione di *network* genici che cooperano nella risposta cellulare. Gli *array* più diffusi si distinguono per la tecnologia di base impiegata; quelli attualmente più utilizzati sono i *microarray* a cDNA ed i *microarray* ad oligonucleotidi, quest'ultima è la tecnologia principale del sistema *Affimetrix Gene Chip*. Uno studio del trascrittoma di *Arabidopsis* utilizzando un *chip* con 7000 sequenze cDNA ha identificato 299 geni inducibili da siccità, 54 da freddo 213 da alte concentrazioni saline e 245 indotti da ABA (Seki et al. 2002a,b).

Più della metà dei geni indotti in condizioni di scarsa presenza di acqua sono risultati sovraespressi anche in presenza di NaCl e/o ABA, indicando la presenza di un significativo *cross-talk* tra stress osmotici di diversa natura. Solo 10% dei geni indotti da carenza idrica, invece, erano sovraespressi anche nello stress da freddo. Similmente, migliaia di geni inducibili sono stati identificati usando un chip *Affimetrix* ad oligonucleotidi rappresentativi di circa 8000 trascritti (Kreps et al. 2002). I risultati ottenuti hanno dimostrato che i geni identificati con la tecnologia a cDNA coincidevano solo debolmente con quelli riconosciuti attraverso il sistema ad oligonucleotidi. La discrepanza dei risultati è imputabile essenzialmente alle differenze tra i due set di geni "spottati" nei due sistemi, solo 1919 geni erano, infatti, in comune nei due esperimenti: Recentemente grazie al progetto *AtGeneExpress* è stato possibile analizzare il trascrittoma di *Arabidopsis* usando il chip *Affimetrix* ATH1 in grado di monitorare l'espressione di 23000 geni; il progetto ha fornito migliaia di informazioni per diversi punti sperimentali individuando geni espressi in vari tessuti, in diversi stadi di sviluppo ed in differenti condizioni di crescita, tra cui la presenza di stress e trattamenti ormonali (Schmid et al., 2005).

L'espressione genica in risposta ad alte concentrazioni saline è stata analizzata per la prima volta usando un *chip* a cDNA (Kawasaki et al., 2001). Recentemente, un set di circa 1700 geni *stress-responsive* di riso sono stati analizzati mediante microarray. I cDNA sono stati isolati da piante di riso esposte a siccità, freddo o alte concentrazioni saline (Rabbani et al., 2003) ed impiegati successivamente nel *microarray*. I dati hanno confermato che 73 geni erano veramente inducibili da stress. Inoltre, l'espressione del 40% dei geni sovraespressi in condizioni di scarsa disponibilità di acqua e in presenza di sale erano indotti anche in risposta al freddo. Infine, l'espressione del 98% dei geni indotti da sale e da ABA erano sovraespressi anche in condizioni di siccità. I dati hanno indicato l'esistenza di un sistema di regolazione sostanzialmente comune tra la risposta alla siccità e quella ad alte concentrazioni di sale o ABA; al contrario esiste solo una debole relazione tra la risposta al freddo e quella alla siccità. I risultati ottenuti in riso, sono, tra l'altro confrontabili con quelli ottenuti in *Arabidopsis* (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

I *microarray* si sono rivelati un potente mezzo per lo studio dei geni *down-regulated*, la cui trascrizione, cioè, risulta inibita dall'imposizione dello stress. Bray e collaboratori (2004), unificando i dati *microarray* prodotti in *Arabidopsis* in risposta a stress di diversa natura, (Seki et al., 2002; Kreps et al., 2002; Kawaguchi et al., 2004), hanno identificato 1369 geni repressi, di cui solo tre geni sono risultati comuni negli esperimenti considerati. Lo studio di geni *down-regolati*, non sempre approfondito, potrebbe contribuire a delucidare meccanismi molecolari ancora poco chiari nella risposta a stress (Seki et al., 2002).

E' importante comunque, considerare che un'alterazione dell'espressione di un gene, ed in particolare la sua induzione, non necessariamente implica che il gene abbia un ruolo nell'adattamento delle piante a stress: l'espressione di molti geni potrebbe essere il risultato di danni cellulari (Bray, 2002). Inoltre, c'è da tener presente che la modulazione della trascrizione di un gene costituisce solo il primo livello di regolazione della sua espressione. Infatti studi sulla risposta a stress osmotico hanno dimostrato che non sempre l'accumulo di mRNA relativo ad un gene causa un accumulo della proteina da esso codificata ma che possono intervenire sistemi di regolazione post-trascrizionale. Per esempio, condizioni di stress osmotico inducono elevati livelli di trascritto del gene codificante l'acquaporina

RD28 (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992) a cui non corrispondono simili livelli di accumulo di proteina (Daniels *et al.*, 1994). Un ulteriore punto di regolazione dell'attività di una proteina è costituito dalla regolazione post-traduzionale. Molte proteine vengono attivate-inattivate tramite fosfo-defosforilazione ad opera di chinasi e fosfatasi (Lewin, 1999).

Sulla base di quanto detto, è chiaro quindi che oltre a identificare geni la cui espressione è regolata durante la risposta a stress, è necessario determinare le funzioni di questi geni per capire il loro ruolo e il loro contributo nei meccanismi di adattamento a stress.

1.3.2 Analisi genomica funzionale: strategie di forward e reverse genetics per l'assegnazione di funzioni geniche

Gli studi di genomica funzionale mirano alla comprensione della funzione delle proteine codificate dai singoli geni ovvero a stabilire il rapporto tra un gene ed il suo fenotipo. Uno dei principali strumenti per studiare tale relazione è rappresentato dallo studio di mutanti. L'analisi di mutanti può essere effettuata seguendo principalmente due vie: la prima, la strategia di *forward genetics*, prevede lo studio di mutanti selezionati sulla base di un fenotipo di interesse (es. la suscettibilità e/o tolleranza ad un evento di stress) per poi risalire al gene mutato responsabile di quel fenotipo. L'altra strada, nota come approccio di *reverse genetics*, sviluppata in tempi più recenti in concomitanza dell'aumento di conoscenze sui genomi vegetali, prevede la selezione di mutanti per una data sequenza genica alla ricerca di un fenotipo dipendente dal gene in esame.

Le aumentate conoscenze del genoma della specie modello *A. thaliana* e di tecniche efficienti di trasformazione genetica hanno permesso lo sviluppo di sofisticati strumenti genetici con la creazione di numerose popolazioni mutanti utili sia in approcci di *forward* che di *reverse genetics* (Bonhert *et al.*, 2006; Koiwa *et al.* 2006). Nell'ultimo decennio sono state sviluppate numerose popolazioni dette *loss-of-function* o *knockout*, ottenute tramite mutagenesi inserzionale casuale mediante l'inserzione di DNA esogeno, quali l'elemento T-DNA (*T-DNA tagging*) o un elemento trasponibile (*transposon tagging*) all'interno di una pianta ospite per inattivare sequenze geniche (Ramachandran e Sundaresan, 2001; Alonso *et al.*, 2003). Molti centri di ricerca si sono specializzati nella creazione e *screening* di mutanti di *Arabidopsis* e mettono oggi a disposizione ampie collezioni di mutanti relativi a quasi tutti i geni presenti nel genoma di questa specie (Krysan *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2003; Koiwa *et al.*, 2006). La mutagenesi inserzionale è utile nel caso in cui il silenziamento di un gene produce un fenotipo evidente; tuttavia nei sistemi eucariotici, il *knock out* genico non sempre porta a questo risultato, a causa della presenza di copie multiple del gene di interesse, oppure, al contrario la mutazione può risultare letale. Una strada alternativa per evidenziare fenotipi associati a questi geni consiste nel cercare di aumentare il loro livello di espressione producendo mutazioni dominanti dette *gain-of-function*.

L'acquisizione di una nuova funzione genica può essere ottenuta direttamente mediante sovra-espressione/sotto-espressione di un gene *target* in piante transgeniche (tecnologia senso/antisense) oppure con tecniche ad approccio casuale note come *activation tagging*. Quest'ultima si basa sulla trasformazione casuale con

costrutti portanti *enhancer* o promotori forti capaci di indurre la sovra-espressione dei geni a valle del punto di inserzione (Walden et al., 1994; An et al., 2005). Inoltre sono stati sviluppati altri strumenti genetici per produrre ed identificare mutanti anche in specie per le quali non sono disponibili collezioni di mutanti inserzionali. Tra di essi la tecnica nota come TILLING (*Target Induced Local Lesion In Genome*), capace di combinare la classica mutagenesi casuale per mezzo di agenti chimici (EMS) con una selezione basata sull'amplificazione delle sequenze *target* mediante PCR, è probabilmente quella più nota (McCallum et al., 2000).

Lo studio di mutanti ha contribuito enormemente alla comprensione dei meccanismi di resistenza alla siccità, e agli stress osmotici in generale, permettendo l'identificazione di importanti componenti del *pathway* di trasduzione del segnale di stress (Bonhert et al., 2006; Koiwa et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006) Ad esempio, il ruolo svolto dall'ABA come mediatore della risposta molecolare a stress idrico è stato chiarito a partire dagli anni 80 attraverso l'uso dei mutanti *flacca* di pomodoro (Neil e Horgan, 1985; Grillo et al., 1995). Negli anni '90, approcci di *forward genetics* hanno consentito di descrivere i *pathway* regolativi dipendenti da ABA e coinvolti in diversi meccanismi di resistenza mediante l'uso di mutanti insensibili all'ABA (*ABA insensitive*) e mutanti incapaci di sintetizzare ABA (*ABA deficient*) isolati in diverse specie (arabidopsis, girasole, pomodoro e patata). Lo studio di questi mutanti ha consentito di identificare geni indotti da siccità la cui espressione è mediata dall'accumulo di ABA e di comprenderne il ruolo nell'ambito dei meccanismi di resistenza (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bonetta e McCourt, 1998; Versleus e Bray, 2006). Ad esempio, i mutanti *ABA insensitive abi1* e *abi2* di Arabidopsis hanno permesso di identificare due geni che codificano per proteine fosfatasi 2C coinvolte nella risposta molecolare all'accumulo di ABA, i corrispondenti mutanti sono di conseguenza incapaci di indurre alcuni geni normalmente espressi in risposta a siccità (Chak et al., 2000).

1.4 Scopo e contenuto della tesi

La presente tesi si inserisce nelle attività di ricerca dell'Istituto di Genetica Vegetale (CNR-IGV, Sezione di Portici) volte all'identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti nella tolleranza a stress osmotici in patata, specie di grande importanza economica, estremamente suscettibile diversi tipi di stress ambientali che ne limitano fortemente la produzione e la qualità del prodotto.

In tale ambito le ricerche hanno riguardato l'analisi del trascrittoma di patata in risposta a stress idrico a breve e a lungo termine utilizzando popolazioni di cellule di patata sottoposte a condizioni di stress idrico prolungato (adattamento) o di breve durata (*shock*) indotte dall'aggiunta nel mezzo di coltura di polietilenglicole (PEG 20%). Le diverse popolazioni cellulari sono state precedentemente caratterizzate dal punto di vista fisiologico, biochimico e molecolare (Leone et al., 1994a, b, Costa et al., 1999, Ambrosone et al., 2008. Options mediterraneeenes, in corso di stampa) mostrandosi un ottimo sistema sperimentale per lo studio dei complessi meccanismi di risposta a stress osmotici.

Nel presente lavoro, l'analisi del trascrittoma di patata mediante cDNA microarray, ha permesso l'identificazione di numerosi geni differenzialmente regolati dalle condizioni di stress idrico utilizzate, alcuni dei quali già noti per il loro contributo nella risposta molecolare a condizioni di stress ambientali. In particolare è stato identificato il gene *rgga*, codificante per una proteina *RNA-binding* e sovraespresso specificamente in

condizioni di adattamento allo stress idrico. Al fine di identificare il ruolo del gene *rgga* nei meccanismi di adattamento a stress è stata effettuata una sua caratterizzazione molecolare e funzionale in patata e *Arabidopsis* utilizzando approcci sperimentali innovativi.

In particolare le attività svolte hanno riguardato:

- L' IDENTIFICAZIONE DI UN SET DI GENI REGOLATI DA CONDIZIONI DI STRESS IDRICO IN PATATA mediante analisi di dati ottenuti dallo studio del trascrittoma di patata con la tecnologia *microarray*. Presso i laboratori dell'ENEA (Trisaia) erano stati precedentemente effettuati esperimenti di *microarray* (ibridazione e analisi dei vetrini) utilizzando RNA estratti da tre diverse popolazioni cellulari di patata (cellule controllo, cellule sottoposte a stress idrico di breve durata e cellule adattate allo stress idrico e ibridizzato sui vetrini (*Potato 10k*) forniti dal TIGR e contenenti di circa 10000 cloni cDNA di patata. I dati forniti dal *microarray* sono stati impiegati nel presente lavoro per un'analisi globale dei cambiamenti dell'espressione genica in risposta a stress idrici di breve e lunga durata e l'identificazione di geni con profili di espressione specifici delle condizioni di stress utilizzate.
- LA VALIDAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI NEGLI ESPERIMENTI DI *MICROARRAY*. I risultati ottenuti dal *microarray* hanno consentito la selezione di un *subset* di circa 25 geni, la cui espressione, in risposta a condizioni di stress, è stata ulteriormente caratterizzata in sistemi cellulari e in tessuti di piante adulte mediante tecnologia di *quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR).
- ANALISI DEL RUOLO FUNZIONALE DI GENI NELLA RISPOSTA A STRESS E NEI MECCANISMI DI TOLLERANZA. E' stata effettuata la caratterizzazione dettagliata del gene *rgga* codificante per una *RNA-binding protein* la cui espressione è regolata specificamente in risposta a condizioni di stress di lunga durata. A tal scopo è stato utilizzato un approccio multidisciplinare basato sull'uso di *Arabidopsis*, specie per la quale sono disponibili strumenti avanzati di analisi (archivi di dati genomici informativi e di materiali genetici) ampiamente utilizzati durante il progetto e che ha consentito l'applicazione di strategie di "*gain and loss of function*" per lo studio del ruolo del gene *rgga* nella risposta a stress osmotico. Mediante produzione di piante transgeniche, sono stati, inoltre, studiati la localizzazione proteica e l'attività *in vivo* del promotore di *rgga*.

I dati ottenuti nel lavoro di tesi hanno permesso di identificare geni chiave coinvolti nella complessa risposta allo stress idrico in cellule e piante di patata. In particolare l'analisi molecolare e funzionale del gene *rgga*, ha evidenziato il ruolo di tale gene nei meccanismi cellulari di adattamento/tolleranza a condizioni di stress osmotico.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Materiale vegetale

In questo studio sono state utilizzate piante e colture cellulari di *Solanum tuberosum* ed *Arabidopsis thaliana*:

2.1.1 Colture cellulari e piante di *S. tuberosum*

Colture di cellule in sospensione di patata (*Solanum tuberosum*, cv Désirée) sono state allevate in substrato liquido P31 contenente Murashige-Skoog (ICN, Flow) 4,4 g/l, Caseina idrolizzata 2 g/l, Saccarosio 30 g/l, Acido 2,4-diclorofenossiacetico pH 5.8 (50 mg/ml) 5ml/l, Kinetina(1 mg/ml) 250 µl/l, Tiamina (9,9 µg/ml) 1ml/l, Piridossina (9,5 µg/ml) 1ml/l, Acido nicotinico (4,5 µg/ml) 1ml/l. Le cellule sono state mantenute in agitazione a 28°C al buio e sono disponibili presso i laboratori del CNR-IGV, Sezione di Portici.

Tuberi vernalizzati di patata sono stati seminati in terreno di crescita perlite/torba (1:1). Le piante germinate dai tuberi sono state allevate nelle serre del Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali.

2.1.2 Colture cellulari e piante di *A. thaliana*

Sospensioni di cellule di *A. thaliana* MM2d (ecotipo *L. erecta*), gentilmente fornite dal prof. Murray dell'Università di Cambridge (Menges & Murray, 2002), sono state cresciute in terreno MS, contenente 4.3 g/l sali di *Murashige & Skoog*, 3% saccarosio, 0.5 mg/l NAA, 0.05 mg/l kinetina. Le cellule sono state propagate ogni sette giorni diluendo 3.5 ml di una coltura al settimo giorno di crescita in 100 ml finali di substrato e cresciute in beute da 250 ml, a 27° in costante agitazione (130 rpm), al buio. La crescita della coltura cellulare di *A. thaliana* è stata determinata prelevando quotidianamente per nove giorni un'aliquota di cellule, a partire dal primo giorno di coltura. L'aliquota è stata diluita aggiungendo 1ml di acido cromico al 5%, lasciato in azione tutta la notte a temperatura ambiente, in modo da separare gli aggregati cellulari. Le cellule sono state filtrate attraverso una siringa da 1 ml (per 5 volte) e contate con un emocitometro al microscopio ottico. La vitalità delle cellule di *A. thaliana* è stata verificata mediante colorazione con fluoresceina diacetato (FDA) (Widholm, 1972). A 100 µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti 2 µl di FDA (5 mg/ml) e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza. Cellule al settimo giorno dalla propagazione sono state diluite 1:12.5 in mezzo di coltura MS in modo da avere 2.4×10^6 cell/ml.

Sterilizzazione dei semi

Semi di *A. thaliana*, sono stati sterilizzati con una soluzione di 0,1% candeggina commerciale, 0,05% Tween-20, per 10 minuti e lavati ripetutamente (5/6 volte) con acqua bidistillata sterile; dopo aggiunta di 500 µl di agar 0.1%, i semi sono stati mantenuti a 4°C per 72 ore, per interrompere la dormienza.

Crescita *in vitro* di piante di *A. thaliana*

I semi sterili sono stati seminati in piastre Petri (120-130 semi per piastra) contenenti 15 ml di substrato di crescita GM preparato con 4,3 g/l sali *Murashige & Skoog*, 1% agar, 10 ml vitamine 100X (10 g/l mioinositolo, 1 g/l tiamina, 1 mg/l acido nicotinico, piridossina 1 mg/l) e 3% saccarosio, portato a pH 5.7 con KOH; supplementato con o

senza kanamicina (50 mg/l). Piantine di *A. thaliana* sono state allevate *in vitro* in condizioni di crescita controllate (16h di luce/8h di buio; luce 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $t=23^{\circ}\text{C}$).

Crescita *in vivo* di piante di *A. thaliana*

Piantine di 10 giorni sono state trapiantate *in vivo* su terriccio "Terrabri" mescolato a sabbia di fiume (1:5) oppure su terriccio semplice e trasferite in camera di crescita ($t=25^{\circ}$; umidità=70%).

2.1.3 Condizioni e trattamenti di stress

A) *patata*

Cellule di patata esposte a bassi potenziali idrici mediante trasferimento in mezzo di coltura contenente Polietilenglicole 8000 (PEG), agente osmotico che limita la disponibilità di acqua, erano già disponibili nei laboratori del CNR-IGV, Sezione di Portici (Leone et al., 1994).

Condizioni di *shock* osmotico sono state indotte nella popolazione di cellule controllo, mediante trasferimento di queste in substrato contenente PEG al 20%. Le condizioni sperimentali così ottenute sono state definite, nella presente tesi, "condizioni *shock*".

A partire dalla popolazione di cellule controllo (cfr. 2.1.1) è stata ottenuta, inoltre, una sospensione di cellule, "condizione di adattamento" in seguito alla somministrazione graduale di PEG 8000 (da 0 a 5, 10, 15 e 20 % w/v, corrispondenti ad un potenziale osmotico di circa -0,5; -1,0; -1,4; -1,85 e -2,3 Mpa rispettivamente) nell'arco di 60 gg di PEG fino al 20% nel mezzo delle cellule controllo.

Ad ogni ciclo di trasferimento in substrato fresco è stata determinata la crescita (determinazione del peso secco) e la vitalità (colorazione con fluoresceina diacetato) delle sospensioni cellulari controllo e di quelle "adattate" e "stressate" utilizzando protocolli standard disponibili presso il CNR-IGV, Sezione di Portici (Leone et al, 1994a). L'RNA estratto dalle popolazioni cellulari mantenute in condizioni controllo e dalle popolazioni cellulari esposte ai due trattamenti (*shock* e adattamento) è stato utilizzato per lo studio del trascrittoma di patata (Fig. 1).

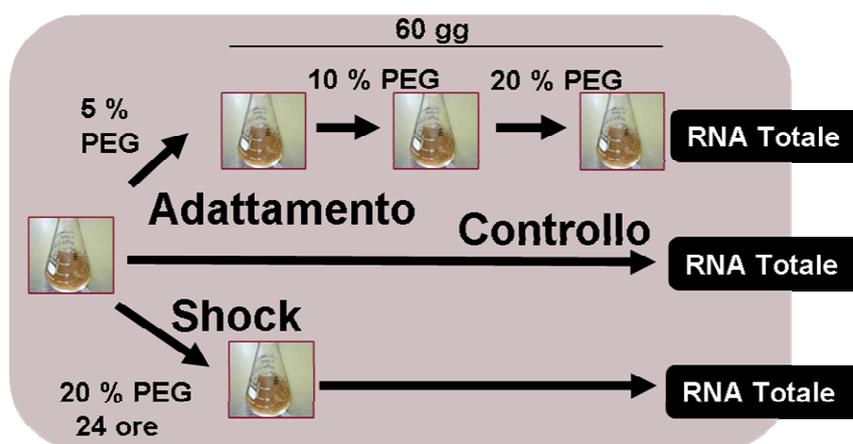


Figura 1. Colture cellulari in sospensione di *S. tuberosum*. Lo *shock* idrico è stato ottenuto trasferendo le cellule di patata, allevate in condizioni controllo, in un substrato contenente una concentrazione finale di 20% polietilenglicole (PEG). L'adattamento è stato ottenuto trasferendo le cellule di patata in substrati contenenti concentrazioni crescenti di PEG (20% finale) nell'arco di 60 giorni. L'RNA estratto dalle differenti popolazioni cellulari è stato impiegato nell'analisi microarray.

Piante di *S. tuberosum* (cv. Désirée) di 4 settimane allevate in perlite/torba (1:1) sono state private di acqua per sette giorni. Piante di patata dello stesso stadio sono state mantenute in condizione di regime idrico regolare. La resistenza stomatica è stata misurata in condizioni controllo ed in presenza di deficit idrico. Le misurazioni sono state effettuate con porometro in triplicato sulla singola foglia considerando almeno 5 foglie per pianta. L'RNA estratto da piante controllo e piante sottoposte a stress è stato utilizzato per studiare il profilo di espressione genica in foglie e radici di *S. tuberosum*.

B) *Arabidopsis*

Sospensioni di cellule di *A. thaliana* MM2d (ecotipo *L. erecta*) sono state esposte per 24 ore a differenti trattamenti da stress. In particolare, popolazioni cellulari, allevate in mezzo liquido, sono state trasferite in MS addizionato con 150 mM NaCl, 50 μ M ABA, 10% PEG; colture cellulari controllo sono state a loro volta trasferite in substrato liquido MS. Al termine di ogni trattamento le cellule sono state raccolte mediante filtrazione su filtri di nylon (\varnothing 37 μ m), lavate con PBS 1X per eliminare il substrato ed immediatamente congelate in azoto liquido, per l'estrazione di RNA successivamente utilizzato per studi espressione genica.

Per lo studio di espressione del gene *rgga*, piantine *wild type* di *A. thaliana* (Columbia) sono state allevate per due settimane *in vitro* su mezzo solido, e successivamente sottoposte a trattamenti da stress di breve e lunga durata. Circa 50 piantine sono state trasferite per 24 ore su substrato contenenti concentrazioni crescenti NaCl (50mM, 100 mM, 150 mM); per il trattamento di stress di lungo periodo circa 80 piantine sono state trasferite per sette giorni su substrati addizionati con 120 mM NaCl, 35% PEG, 10 μ M ABA.

Per l'analisi dei livelli di prolina, piantine di 4 settimane allevate in vivo in camera di crescita, secondo le condizioni descritte nel paragrafo 2.1, sono state sottoposte a stress salino e stress idrico. Le piante sono state annaffiate con una soluzione 100 mM NaCl per 5 giorni oppure sono state private di acqua per sette giorni.

Dopo ogni trattamento le piantine sono state lavate con H₂O bidistillata e immediatamente congelate in azoto liquido per l'estrazione di RNA.

2.2 Estrazione di RNA totale

Prima dell'estrazione di RNA sia le soluzioni che la vetreria utilizzate sono state trattate con dietil pirocarbonato (DEPC) allo 0,1%, per inattivare eventuali RNAsi cellulari contaminanti, e poi sterilizzate in autoclave, a 120 °C per 30 min, per disattivare il DEPC.

L'RNA è stato estratto secondo diversi protocolli:

- 1) metodo basato sull'utilizzo di guanidina tiocianato nella soluzione di estrazione e di fenolo-cloroformio (Chomczynski and Sacchi, 1987). L'RNA estratto secondo questo protocollo è stato impiegato per l'analisi microarray.
- 2) metodo di estrazione (SGED_SOP_3.2.1: RNA Isolation using Phenol, www.tigr.org) basato sull'impiego di fenolo e LiCl. L'acido ribonucleico estratto secondo tale protocollo è stato impiegato per il Northern blotting non radioattivo.
- 3) metodo di estrazione con "RNeasy plant mini kit" della Qiagen. L'RNA estratto con il kit è stato impiegato in diverse analisi qRT-PCR e RT-PCR.

La concentrazione dei campioni di RNA estratti è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro. La purezza dell'estrazione (assenza di eventuali sostanze

contaminanti, quali proteine, polisaccaridi e fenolo), è stata stimata dalla misura del rapporto Assorbanza O.D.260/Assorbanza O.D.280. I campioni sono stati considerati per le successive analisi quando il rapporto $A_{O.D.260}/A_{O.D.280}$ presentava un valore compreso tra 1,7 e 2,0.

2.3.1 Elettroforesi e verifica dell'integrità dell'RNA

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

Tampone MOPS 10X

Acido N-morfolino-propansulfonilico pH 7 0,2 M
Sodio acetato 80 mM
EDTA 10 mM

Tampone denaturante

Formammide 750 µl
10X MOPS 120 µl
37% formaldeide 250 µl
10 µg/µl bromuro di etidio 1 µl

Gel di agarosio/formaldeide (60 ml)

Agarosio (1,2%) 0,75 g
1X MOPS 6 ml
Formaldeide 3,5 ml
H₂O sterile 50,5 ml

I campioni eluiti nel tampone denaturante sono stati incubati per 5 min a 65°C e successivamente sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% in condizioni denaturanti per la presenza di formaldeide al 6%. La corsa è stata condotta a 50 V costanti, utilizzando come tampone il MOPS 1X, in una camera elettroforetica previamente trattata con H₂O₂ ed etanolo assoluto, per allontanare eventuali RNasi contaminanti. L'integrità dell'RNA è stata controllata su un transilluminatore per la presenza delle bande relative alle subunità 28S e 18S dell'RNA ribosomiale, il cui rapporto 2:1 è indicativo di assenza di degradazione.

2.3 Studio di espressione genica

In questa tesi sono state impiegate diverse tecniche per lo studio di espressione genica. L'analisi microarray è stata condotta in un periodo antecedente il lavoro di tesi ed ha utilizzato RNA estratto da cellule di patata per lo studio del trascrittoma in diverse condizioni di stress idrico; gli esperimenti microarray sono stati condotti presso il centro di ricerca ENEA (Trisaia, matera), utilizzando protocolli disponibili presso il suddetto centro. La qRT-PCR è stata impiegata per validare i dati microarray e per studiare in maniera accurata l'espressione di geni di interesse in cellule e piante di *S. tuberosum* e *A. thaliana*. Il Northern blotting con marcatura non radioattiva è stato impiegato per lo studio di espressione del gene *rgga* in piante di *A.*

thaliana. Infine, l'amplificazione RT-PCR è stata utilizzata per dimostrare l'assenza di trascritto *rgga* in linee mutanti *knockout* di *Arabidopsis*, omozigoti per l'introggressione del T-DNA

2.3.1 qRT-PCR e RT PCR

La validazione dei dati microarray e lo studio di espressione di geni di interesse è stata effettuata mediante Real Time PCR (qRT-PCR). L'RNA totale è stato trattato con la Deossiribonucleasi I (*Dnase I, Amplification Grade*, Invitrogen). La sintesi del primo filamento di cDNA è stata eseguita con l' Oligo(dT)12-18 (Invitrogen) e l'enzima trascrittasi inversa *SuperScript II* (Invitrogen). Il cDNA è stato amplificato con la *SybrGreen PCR Master Mix*, utilizzando il sistema di rilevazione e di analisi dell'Applied Biosystem (ABI PRISM 7700). I componenti della reazione finale sono stati: Buffer *SybrGreen 2X* 12,5 µl, 10µM oligo *forward*, 10µM oligo *reverse*, H₂O bidistillata fino a 25 µl. L'amplificazione è stata condotta secondo i seguenti parametri per 40 cicli totali: attivazione dell'enzima (*hot start*) 50°C per 2 minuti; denaturazione 95°C per 15 secondi; *annealing* ed estensione 58°C per 1 minuto. Gli oligonucleotidi sono stati costruiti in modo tale da avere un amplicone tra 100-140 bp. Diversi geni *housekeeping* (actina, gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, ubiquitina, tubulina, fattore di elongazione 1-alfa, rRNA 18S) sono stati testati come controlli endogeni della reazione. L' RNA ribosomiale 18S è stato utilizzato per la normalizzazione di qRT-PCR in cellule di patata ed *Arabidopsis*. Il gene codificante per un fattore di elongazione 1-alfa è stato, invece, impiegato per normalizzare reazioni relative allo studio di espressione in tessuti di patata ed *Arabidopsis*.

La verifica dell'assenza del trascritto nel mutante *knockout* di *A. thaliana* è stata effettuata mediante RT-PCR "two step" (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). L'RNA è stato retrotrascritto come sopra descritto. Il cDNA è stato usato come stampo per la successiva reazione di PCR. La temperatura e la durata dell'*annealing* variano a seconda della *Tm* degli oligonucleotidi utilizzati, riportati in tabella I. Al termine dell'amplificazione, i prodotti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% contenente 0.5 µg/ml di bromuro di etidio, in tampone 1X TAE per 30 min a 80V. Le dimensioni dei prodotti amplificati ottenuti sono state stimate confrontando la migrazione delle bande con un marcatore di peso molecolare noto (DNA 1Kb *ladder*, Invitrogen).

2.3.2 Northern blotting

Gli RNA ottenuti, come descritto nel paragrafo 2.2, sono stati sottoposti ad analisi Northern. L'analisi consiste nelle seguenti fasi: separazione degli RNA su gel di agarosio in condizioni denaturanti; trasferimento su filtro; preibridazione, ibridazione e lavaggi del filtro; esposizione del filtro su film autoradiografico.

Venti microgrammi di RNA estratto da giovani piantine di *A. thaliana* sottoposti a diversi stress (NaCl, ABA, PEG) sono stati a separati per gel-elettroforesi secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.2.

Dopo la corsa elettroforetica, di circa 4 h, il gel è stato posto in H₂O-DEPC in agitazione per 10 min per allontanare l'eccesso di formammide, e successivamente trasferito su membrana di nylon (HybonN; Amersham) per capillarità in presenza di SSC 20 X.

L'RNA è stato, infine, fissato utilizzando l'apparecchiatura UV-linker della Biorad.

SOLUZIONI

SSC 20X

NaCl	3M
Sodio citrato pH 7,0	0,3M

Un frammento di 500 bp amplificato dalla sequenza codificante del gene *rgga* è stato utilizzato come sonda per l'analisi *Northern*. La sonda è stata marcata mediante PCR utilizzando dUTP coniugati con digossigenina (Roche):

PCR

volume finale 25µL
 a volume H₂O
 2,5 µl Buffer 10X
 1,5 µl MgCl₂
 4 µl dNTP (200 µM finale)
 1 µl Primer For
 1 µl Primer Rew
 0,5 µl Taq
 100ng templatò

La verifica della marcatura è stata effettuata mediante gel elettroforesi; la sonda amplificata con dUTP coniugati alla digossigenina ha un peso molecolare più alto e, quindi, corre più lentamente in riferimento allo stesso frammento amplificato con dNTP non coniugati.

La fase di *detection* del northern è stata condotta utilizzando il *kit DIG High Prime DNA Labelling and detection starter kit II* seguendo le istruzioni del produttore (Roche). La membrana è stata preibridizzata a 50 °C nella soluzione DIG easy Hyb per 30 min. La sonda marcata (25ng/ml di soluzione di ibridizzazione) è stata denaturata a 94°C per 5 min; l'ibridizzazione del filtro di nylon con la sonda marcata è stata effettuata a 50 °C in rotazione *overnight*. I lavaggi sono stati condotti in concentrazioni decrescenti di SSC (2x – 0.5) rispettivamente a temperatura ambiente ed alla temperatura di ibridizzazione (50 °C). Il filtro è stato successivamente lavato per 5 minuti con una soluzione di acido maleico (0,1 M Acido Maleico, 0,15 M NaCl, pH 7.5) + 0,3% (v/v) Tween 20 e saturato con una soluzione blocking 1x (Roche). Un anticorpo monoclonale (1:10000) anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina è stato incubato per 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Il filtro è stato sottoposto a lavaggi con la soluzione di acido maleico e successivamente è stato equilibrato in una soluzione di *detection* (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 9,5). La membrana è stata incubata per 10 min a 37 °C con una soluzione di CPSD; la defosforilazione enzimatica catalizzata dalla fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo è stata rivelata mediante esposizione su pellicola autoradiografia (Kodak).

2.4 Ottenimento e caratterizzazione di piante transgeniche di *A. thaliana*

In questo lavoro sono state prodotte piante transgeniche di *A. thaliana* mediante trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. In particolare sono state ottenute:

- piante sovraesprimenti il gene *rgga* codificante per una proteina RNA-binding;
- piante sovraesprimenti la proteina di fusione YFP-RGGA;
- piante esprimono il gene *gus* sotto la guida del promotore endogeno del gene *rgga*

Di seguito sono riportati le attività principali svolte per l'ottenimento di piante transgeniche.

2.4.1 Costruzione di vettori mediante tecnologia Gateway™

Il sistema di clonaggio Gateway™ è stato utilizzato per l'ottenimento di vettori binari da utilizzare per la trasformazione genetica di *A. thaliana* mediata da *A. tumefaciens*. La tecnologia, sfruttando siti di ricombinazione ingegnerizzati (*att*) del fago lambda, permette il trasferimento di cloni mediante reazioni enzimatiche mediate da topoisomerasi specifiche. Il sistema si basa sull'utilizzo di un vettore *shuttle* (*entry vector*) che accoglie il clone e, successivamente, lo trasferisce in un vettore di espressione impiegato per la trasformazione (Fig. 2) (www.invitrogen.com/).

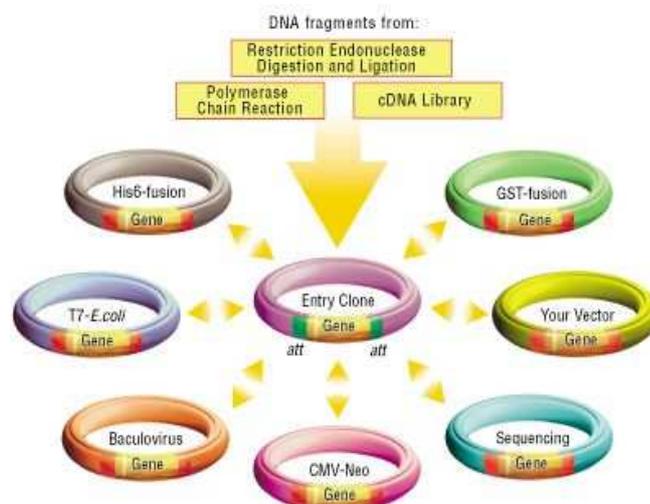


Figura 2. Schema rappresentativo della tecnologia di clonaggio Gateway™

2.4.2 Ottenimento di vettori shuttle

La sequenza codificante completa del gene At4g16830 (*rgga*) di *A. thaliana* e la stessa sequenza privata del codone di stop sono state amplificate con oligonucleotidi specifici contenenti i siti di ricombinazione *att*; il clone genomico U22150 fornito dal TAIR è stato impiegato come template nella reazione mediata da una Taq polimerasi ad alta fedeltà (*Pfx*, Invitrogen).

Un frammento di circa 2 kb della regione a monte dell'ATG d'inizio del gene *rgga* è stato amplificato con oligonucleotidi specifici contenenti i siti di ricombinazione att, mediante amplificazione con *Pfx* da DNA genomico estratto da piante di *A. thaliana*. I frammenti amplificati sono stati purificati da gel utilizzando *Qia Quick Gel Extraction kit* (Qiagen). Gli ampliconi purificati sono stati clonati nell'entry vector pDONR207 (Invitrogen) (Fig. 3), mediante reazione *BP clonase gateway* in accordo con le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La reazione è stata impiegata per la trasformazione del ceppo DH5alfa di *Escherichia coli* mediante *heat shock*. La coltura batterica trasformata è stata piastrata su terreno LB selettivo per la presenza di gentamicina (30mg/l).

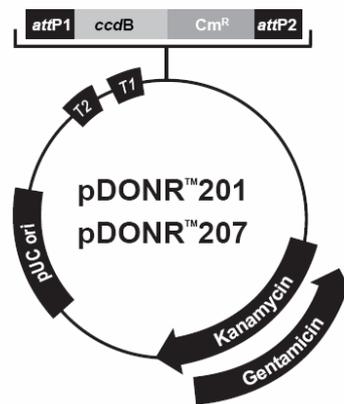


Figura 3. Plasmide pDONR207 utilizzato come vettore shuttle nel sistema di clonaggio gateway.

2.4.3 Ottenimento di vettori binari

I vettori shuttle ottenuti sono stati impiegati per il clonaggio in vettori binari compatibili con il sistema gateway (Tab. 2). La sequenza codificante completa di *rgga*, contenuta nel vettore pDONR207 è stata trasferita mediante LR clonase gateway al C- terminale del peptide FLAG nel vettore di espressione pEG202 sotto il controllo del promotore costitutivo 35S. La sequenza codificante completa di *rgga* è stata trasferita allo stesso modo al C-terminale della YFP (Yellow Fluorescens Protein) nel vettore di destinazione pEG101. La sequenza codificante di *rgga* privata del codone di stop, inoltre, è stata clonata all'estremità N-terminale della YFP nel vettore pEG104. Infine la sequenza del promotore, contenuta nel vettore pDONR207 è stata fusa alla sequenza del gene *gus* nel vettore binario gateway pMDC164.

Vettore	Referenza	Utilizzo
pEG202	Earley K. W., 2006	Sovraespressione del gene <i>rgga</i>
pMDC164	Curtis M.D. and Grossniklaus U., 2003	Studio del promotore <i>rgga</i> (Fusione al gene <i>gus</i>)
pEG101	Earley K. W., 2006	Localizzazione proteica con YFP (fusione C- term)
pEG104	Earley K. W., 2006	Localizzazione proteica con YFP (fusione N- term)

Tabella 2. Elenco di vettori binari, compatibili con il sistema gateway, utilizzati per la trasformazione di *A. thaliana*

2.4.4 Trasformazione genetica di *A. thaliana* mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

Il ceppo di *A. tumefaciens* LBA4404 contenente il pTi helper pAL4404 è stato utilizzato per la trasformazione genetica di *A. thaliana*. I vettori pEG202:*rgga*, pMDC:promotore(*rgga*), pEG101:*rgga*, pEG104:*rgga* sono stati trasferiti nel ceppo competente di *A. tumefaciens*, mediante trasformazione con heat shock, come di seguito riportato:

Le cellule di *A. tumefaciens* LBA4404, tenute ad -80°C sono state scongelate lentamente in ghiaccio; 1 μg di DNA plasmidico è stato aggiunto alle cellule, le quali sono state immediatamente immerse in azoto liquido. La coltura batterica è stata successivamente scongelata a 37°C per 5 min. È stato aggiunto 1 ml di substrato liquido di crescita (YEP) e la soluzione batterica è stata incubata per tre ore a 28°C . Le cellule infine sono state piastrate su substrato selettivo contenente kanamicina per la selezione delle colonie trasformate con il vettore binario. Le colonie positive, cresciute su substrato selettivo, sono state analizzate mediante PCR (§ 2.7.1) utilizzando oligonucleotidi specifici (Tab. 3). Alcune colonie risultate positive alla trasformazione sono state quindi inoculate in terreno selettivo per l'estrazione del DNA plasmidico. I plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati sequenziati in prossimità della regione di ligazione (dati non mostrati) al fine di controllare la corretta sequenza del clone. Le colonie di *A. tumefaciens* LBA4404 contenenti, in origine, i plasmidi ricombinanti controllati sono state utilizzate per trasformare piante di *A. thaliana* mediante immersione dei bocci fiorali (Clough and Bent, 1998). Nella tabella 3 sono riportati tutti i genotipi ottenuti e studiati nel presente lavoro.

Linea transgenica	costrutto	background	utilizzo
rgga202	pEG202:: <i>rgga</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	sovraespressione del gene <i>rgga</i>
rgga164	pMDC164::promotore (<i>rgga</i>)	<i>A. thaliana</i> Col-0	analisi del promotore
rgga101	pEG101:: <i>rgga</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	localizzazione proteica con YFP
rgga104	pEG104:: <i>rgga</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	localizzazione proteica
rgga ko	clone fornito dal NASC	<i>A. thaliana</i> Col-0	Silenziamento genico

Tabella 3. Lista di piante transgeniche ottenute e caratterizzate nel presente lavoro

2.4.5 Selezione di piante trasformate

L'inserzione nel genoma dei vari geni esogeni è stata verificata mediante amplificazione da DNA genomico estratto da piante risultate positive alla selezione sull'erbicida BASTA (pEG202, pEG101, pEG104) o su antibiotico igromicina (pMDC164). Per l'estrazione del DNA genomico, è stato utilizzato *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Il DNA genomico è stato amplificato con oligonucleotidi specifici per ogni costrutto, le cui sequenze sono riportate in Tab. 4.

Nome gene	Sequenze primer	Utilizzo primer
14-3-3	F 5'-TTTGGCTGAGTTCAAGACCGG-3' R 5'-TTAAGAGCCAGTCCAAGTCGGG-3'	qRT-PCR
sus	F 5'-CATCATTTCCTCAAACCAACC-3' R 5'-GAAGAGGGGTCATGCTTTCC-3'	qRT-PCR
rgga	F 5'-CGTAGTGGAAGTGGCAGAGG-3' R 5'-CCAAGAGATGGGAAGTGGAGC-3'	qRT-PCR
aldh22	F 5'-TGTAGCGAAAGGAGGAGTGC-3' R 5'-CCTTCCGGCCTGTAGTAACC-3'	qRT-PCR
kinase	F 5'-TCATCTACTGCGCCAAAAGG-3' R 5'-TAACACCGCGAAAAGTACC-3'	qRT-PCR
Kinase partner	F 5'-TCCAAAGAAAGGTGTGATTTCG-3' R 5'-TTCCTTGAGTTCACCAAGC-3'	qRT-PCR
Unknown	F 5'-GACTCCAAGTTTCTCCACATGC-3' R 5'-GGAAGAATTGCCCTCATTGC-3'	qRT-PCR
Dek1	F 5'-GTGGCAGCTGCAGTAGAACC-3' R 5'-GTAAGTGGGGCTGCTTCTGG-3'	qRT-PCR
Unknown 2	F 5'-GCAAGGTCACAATCAATGAGC-3' R 5'-CAACTCGGATTTCTGGTTGC-3'	qRT-PCR
40S ribosomal	F 5'-AGACCTTCCCTCCTGATTGG-3' R 5'-CAGGGGAATTTGTCTCATCG-3'	qRT-PCR
Atgb2	F 5'-AACCTCCATCCTCTGTTTCG-3' R 5'-TTCTTAATCCCCGGTACATCC-3'	qRT-PCR
Unknown 3	F 5'-GACAATGGTGCCATGATTCC-3' R 5'-TGACTGGCTTGATGACATGC-3'	qRT-PCR
Rhodanese	F 5'-ATAGGGTTGGTGCTCACTGG-3' R 5'-AAAGTTGCAGCACAAAACACC-3'	
Cation exchanger	F 5'-GTGGGGTAGTGGTAAGATTTGC-3' R 5'-TGGAGGTAGAGAGGCTTAATGG-3'	qRT-PCR
Kelch F-box	F 5'-CAAATATGGCAGGAATCATCC-3' R 5'-TGCTCCTCCTTCTTGTGTCC-3'	qRT-PCR
Glutathione transferase	F 5'-TCAAGGCACTTCCATTTTGC-3' R 5'-CTCTTGCACCTCTCCTTTGC-3'	qRT-PCR
ABC transporter	F 5'-CTCACAAGGTGGTGTCTTCTGG-3' R 5'-CAACACCTCAGCTTCAAGTCG-3'	qRT-PCR
Rbp10	F 5'-ATTCACAAGGTGGTGTCTTCTGG-3' R 5'-GCTCAGCAGCATCAATTTCC-3'	qRT-PCR
Unknown 3	F 5'-GAGCCGAAGAAAGAGGAAGC-3' R 5'-CTGATAACGAGCAGGAACAGG-3'	qRT-PCR
GTP-binding protein	F 5'-ATTGTGCAGAAGGCTGATGG-3' R 5'-GACAACTCCAATGGCTTTTCG-3'	qRT-PCR
Heat shock 81-2	F 5'-AGGTGCCAGACACATCTTGG-3' R 5'-AATGTCAGGCACAAACTGC-3'	qRT-PCR
Sec24	F 5'-GGTGGAGGTGGACAAGTAAGG-3' R 5'-GGCAAAGTTGGTGGAGACC-3'	qRT-PCR
Gdsl lipase	F 5'-GCACAATTCTTGCAGTTAGC-3' R 5'-GGGAGAGACTGAAGGAAGG-3'	qRT-PCR
Unknown 4	F 5'-TGTTGCAGAGATGGTGAAGG-3'	qRT-PCR

Sucrose transporter	R 5'- GATGCGGTAATAGCCACTCC -3' F 5'- GTTTAGCAACCTAGATTTCTGG -3' R 5'- TAGGATCATCTTGTGGGTAGC -3'	qRT-PCR
At4g16830	F 5'- ATGGCAACTTTGAACCCTTT -3' R 5'- TTACTIONGCCCCAAGAGATGG -3'	Verifica silenziamento mutante <i>rgga ko</i>
ATT$rgga$	F-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGCAACTTTGAACCCTTT -3' F5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTACTTGCCCCAAGAGATGG-3'	Clonaggio <i>rgga</i> nel vettore pDONR207
pDONR	F 5'- TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC -3' R 5'- TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC -3'	Sequenziamento clonaggio <i>rgga</i>
<i>gus</i>	F 5'- CAGTTTAAGGTTTACACCTATA -3' R 5'- TCATGACGACCAAAGCCAGT -3'	Verifica trasformazione genetica con costrutto GUS
pYFP	F5-TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'	Verifica trasformazione genetica con costrutto YFP

Tabella 4. Primer utilizzati nel lavoro di tesi

Le piante della generazione T_1 kan^+ di ogni linea trasformata, positive all'amplificazione, sono state autofecondate. I semi T_2 , di ogni pianta risultata positiva per l'inserzione del gene esogeno, sono stati seminati su terreno selettivo per un'analisi di segregazione, per la resistenza alla kanamicina. Le linee di piante omozigoti per una singola inserzione del transgene sono state selezionate mediante analisi di segregazione per un rapporto. Le piante della generazione T_3 sono state impiegate per le successive analisi fenotipiche e fisiologiche.

2.4.6 Caratterizzazione di un mutante knockout di *A. thaliana*.

Il mutante T-DNA inserzionale SALK_143514 (*rgga ko*) è stato identificato nel catalogo SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). I semi ottenuti dal NASC sono stati germinati su terreno selettivo contenente kanamicina (50mg/l). I mutanti omozigoti sono stati selezionati per PCR utilizzando primer disegnati sulle sequenze fiancheggianti la putativa inserzione ed un primer specifico per il T-DNA (Lba1) come raccomandato dal fornitore (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Fig. 4). Una successiva analisi RT-PCR ha confermato l'assenza di trascritto nel mutante inserzionale omozigote.

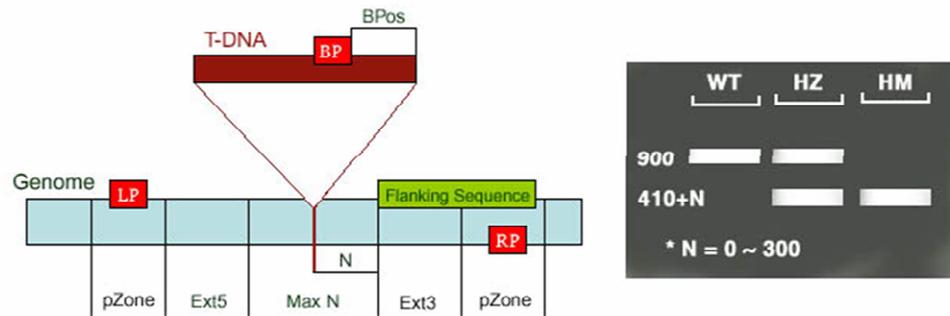


Figura 4. Schema rappresentativo per la caratterizzazione molecolare del mutante *knockout*. I primer (LP e RP) sono stati costruiti sulle regioni fiancheggianti il sito di inserzione del T-DNA. Un primer specifico costruito sul T-DNA, inoltre, permette di discriminare mutanti eterozigoti (HZ) ed omozigoti (HM)

2.5 Estrazione di proteine ed Analisi *Western blotting*

Per l'estrazione di proteine totali in condizioni denaturanti, campioni di cellule vegetali o piante (100-150 mg) sono stati macinati in azoto liquido in presenza di un equal volume (100-150 μ l) del tampone di estrazione contenente 2 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris portato a pH 8.0 con NaOH, addizionato con un cocktail di inibitori di proteasi (P9599; Sigma-Aldrich). Dopo centrifugazione (10' a 13000 rpm, 4°C) è stato prelevato il surnatante. La concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il metodo *Bradford* (*BioRad Reagent Assay; BioRad*), mediante confronto con concentrazioni standard di BSA (albumina di siero bovino). La concentrazione delle proteine negli estratti totali e degli standard è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro ad una assorbanza di 595 nm. Estratti totali proteici (50 μ g) sono stati sottoposti a separazione elettroforetica (SDS-PAGE), su gel di acrilammide al 12% e trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Amersham) come descritto in Sambrook *et al.*, 2000.

La proteina *RGGA* è stata rilevata con un anticorpo policlonale anti-FLAG prodotto in coniglio (F7425, Sigma) che riconosce l'epitopo FLAG fuso all'N- terminale della proteina *RGGA*; l'anticorpo è stato utilizzato in una diluizione 1:5000 in tampone TBS; la proteina di fusione YFP-*RGGA* è stata, invece, rivelata con anticorpo anti-GFP diluito 1:5000 in TBS (A64-55; Invitrogen Molecular Probes). Un anticorpo *anti-rabbit* coniugato con la perossidasi di rafano, diluito 1:10000 in 5% latte povero di grassi in tampone TBS (NA934VS; Amersham) è stato utilizzato per la reazione di chemiluminescenza ECL (Enhanced Chemio-Lumiscence).

2.6 Analisi fenotipiche e fisiologiche

Al fine di valutare l'effetto della modulazione di espressione del gene *rgga* in condizioni controllo ed in condizioni di stress, sono stati utilizzati semi di *A. thaliana* del genotipo Columbia, della linea mutante *knockout* (Salk_143414; *rgga* ko) e semi di almeno tre linee sovraesprimenti il gene *rgga* (*rgga202*). I semi sono stati sterilizzati, vernalizzati e germinati secondo le condizioni descritte nei paragrafi 2.1 e 2.2.

ANALISI DI GERMINAZIONE. Circa 50 semi di ogni genotipo sono stati piastrati su terreno di coltura GM controllo e su terreno addizionato con 60 mM e 120 mM di NaCl o su piastre GM equilibrate con 35% PEG. Il criterio di determinazione della germinazione è stato stabilito sulla espansione di foglie cotiledonari verdi. Ogni esperimento ha previsto almeno tre repliche tecniche. I dati, raccolti dopo sette giorni di trattamenti, sono riportati come media di due esperimenti indipendenti.

ANALISI DI TOLLERANZA. Almeno 10 piante di *A. thaliana* di 14 giorni germinate *in vitro* su terreno GM sono state trasferite su substrati addizionati con 120 mM e 160 mM NaCl o saturate con una soluzione di 35% PEG. I dati sono stati riportati sottoforma di percentuale di sopravvivenza; le piante sono state considerate sopravvissute quando non presentavano segni di necrosi o di sbiancamento delle foglie. Ogni esperimento ha previsto almeno quattro repliche tecniche. I dati, raccolti dopo dieci giorni di trattamenti, sono riportati come media di due esperimenti indipendenti.

DETERMINAZIONE DELLA PROLINA.

Giovani piante di *A. thaliana* allevate *in vivo* sono state sottoposte a stress idrico e stress salino come descritto nel paragrafo 2.2. L'estrazione è stata condotta secondo il metodo descritto da Clausen et al., 2005. 500 mg di tessuto vegetale sono stati macinati in azoto liquido. Il macinato è stato risospeso in una soluzione acquosa di acido 5-sulfosalicilico diidrato (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 artofosforico in rapporto 6:3:1). Tre millilitri della soluzione ottenuta sono stati incubati a 100°C per un'ora. Un millilitro di soluzione è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 546 nm. Le analisi sono state effettuate in triplicato, considerando almeno tre repliche biologiche

2.7 Saggio GUS

Per questo saggio, piantine di *A. thaliana* di quattro giorni sono state trattate come riportato in Scarpella *et al.*, 2004. Le piantine sono state incubate in 90% acetone freddo (-20°C) per 1 h a -20°C e lavate per 5' con 100 mM tampone fosfato (pH 7.7). Per agevolare l'ingresso del substrato della reazione X-gluc, le piantine sono state pretrattate per 15' con il vuoto, prima di essere incubate per 15' a 37°C. I tempi di incubazione sono stati 3, 5, 24 h. La reazione è stata interrotta mediante incubazione in 70% (v/v) etanolo e i campioni mantenuti a 4°C.

Per l'analisi al microscopio le piantine sono state chiarificate con 1% Cloralidrato, come descritto in Weigel e Glazebrook (2002) e osservate con il microscopio binoculare Axioskop 2 (Zeiss, Germany) dotato di ottiche DIC (*Differential Interference Contrast*) secondo la tecnologia Nomarsky. Le immagini sono state acquisite con la camera ProgRes C30 (Jenoptik, Germany).

2.8 Analisi di localizzazione proteica

Piantine di quattro giorni allevate *in vitro* (§ 2.1) sono state colorate in una soluzione 1mg/ml di ioduro di propidio per 20' e analizzate al microscopio confocale TCS-SP (Leica, Germany). La lunghezza d'onda di eccitazione del laser ionico ad Argo è stata settata a 488 nm. I *range* di lunghezza d'onda utilizzati per rilevare le emissioni

della fluorescenza della proteina YFP e del PI (ioduro di propidio) sono stati rispettivamente 507-562 nm e 585-714 nm. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione 512x512 pixel, da un sistema d'analisi di immagine in dotazione al microscopio confocale.

2.9 Analisi statistiche

Le linee di piante omozigoti per una singola inserzione del transgene sono state selezionate mediante analisi di segregazione per un rapporto 3:1, accertato statisticamente con il test χ^2 (chi-quadro). Il test *t Student* è stato utilizzato per valutare i livelli di significatività delle analisi dei livelli di prolina condotte sulle piante transgeniche.

2.10 Analisi bioinformatiche

Le indagini *in silico* sono state condotte utilizzando *software* e *database on line* disponibili principalmente presso il TAIR (www.arabidopsis.org) ed NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In particolare l'algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) è stato impiegato per determinare omologie a livello nucleotidico ed amminoacidico. Le sequenze delle EST spottate sul vetrino sono state aggiornate nel database di Gene Ontology (www.geneontology.org). L'analisi di motivi conservati nella sequenza proteica di *rgga* è stata effettuata tramite il *software ScanProsite* (<http://expasy.org/prosite/>). L'analisi *in silico* della regione del promotore di *rgga* è stata condotta attraverso il *tool* di predizione Athena (<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>)

3 RISULTATI

3.1 Studio del trascrittoma di patata in risposta a stress idrico

Al fine di identificare geni chiave coinvolti nella risposta allo stress idrico in patata, presso i laboratori del CNR-IGV (sezione di Portici) sono state avviate ricerche per lo studio del trascrittoma di colture cellulari di *S. tuberosum* in risposta a differenti condizioni di deficit idrico. L'analisi di espressione su larga scala è stata condotta mediante *microarray* (Fig. 5); l'ibridazione e l'analisi del vetrino sono state effettuate, precedentemente, presso i laboratori dell'ENEA (Trisaia). A tale scopo sono state impiegate tre popolazioni cellulari in sospensione di patata:

- colture cellulari mantenute in condizioni di crescita ottimali (condizione "controllo");
- colture cellulari esposte a condizioni di stress idrico breve (24 ore), ottenuto mediante trasferimento in mezzo di coltura contenente 20% Polietilenglicole (PEG), (condizione "shock");
- colture cellulari esposte a condizioni di stress idrico prolungato, ottenuto in seguito alla somministrazione graduale di PEG, nell'arco di 60 gg, fino al 20% nel mezzo di coltura (condizione di "adattamento").

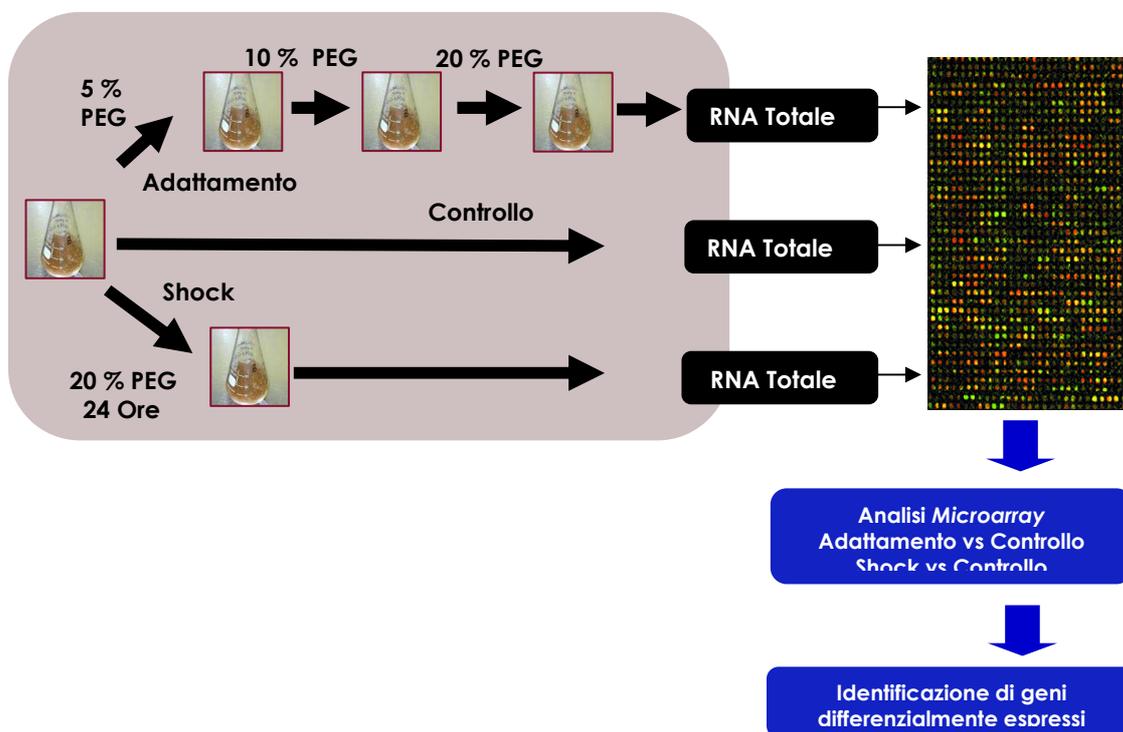


Figura 5. Disegno sperimentale per lo studio della risposta allo stress idrico in patata. Colture cellulari di *S. tuberosum* sono state adattate gradualmente ad incrementi della concentrazione di PEG (Adattamento) oppure sono state trasferite in una soluzione 20% (w/v) di PEG (*shock*). L'RNA estratto da diversi trattamenti è stato utilizzato per ibridare il vetrino *potato 10K* al fine di identificare i geni differenzialmente espressi nelle popolazioni cellulari in studio.

Il PEG, impiegato nel sistema sperimentale, è un agente osmotico che limita la disponibilità d'acqua, mimando ciò che accade naturalmente quando si presentano condizioni di carenza idrica. RNA estratti da popolazioni di cellule in condizioni controllo, *shock* ed adattamento sono stati impiegati per l'analisi del trascrittoma.

Allo scopo di ottenere informazioni dettagliate sulle modificazioni del trascrittoma in risposta al deficit idrico, è stato utilizzato nel nostro sistema sperimentale un vetrino *Potato 10K*; il *chip array*, contenente circa 10000 ESTs derivanti da librerie cDNA di specie e tessuti diversi di patata, è stato sviluppato dal TIGR (*The Institute of Genomic Research*, www.tigr.org) nell'ambito del progetto *NSF Potato Genomics Project*

Il disegno sperimentale ha previsto 6 esperimenti di ibridazione utilizzando RNA di "cellule controllo" e RNA di cellule sottoposte a "shock idrico" marcati con i fluorocromo CY3 e CY5 rispettivamente (incluso un'inversione di fluorocromo) e 6 esperimenti di ibridazione utilizzando RNA di "cellule controllo" e RNA di "cellule adattate" marcati con i fluorocromo CY3 e CY5 rispettivamente (incluso un'inversione di fluorocromo). Le immagini dei vetrini sono state acquisite con uno scanner laser e i dati ottenuti sono stati acquisiti e normalizzati; il rapporto medio, la deviazione standard e il coefficiente di variazione sono stati calcolati per ogni singolo spot per ogni ripetizione. I geni sovraespressi (Up) e sottoespressi (Down) sono stati identificati quando la media dei valori trattamento/controllo era al di sopra di 2 o al di sotto di 0.5, rispettivamente.

Dall'analisi *microarray* è emerso che nelle condizioni sperimentali utilizzate 1055 geni mostravano un profilo di espressione alterato (sovraespressione o repressione) rispetto al trascrittoma delle cellule controllo (Tab. 5).

	Numero geni sovraespressi	Numero geni repressi	Totale geni differenzialmente espressi
Condizioni shock idrico	129	174	303
Condizioni di adattamento	337	415	752
		TOTALE	1055

Tabella 5. Numeri di geni differenzialmente regolati in condizioni di *shock* e di adattamento, identificati mediante *microarray*.

In particolare sono stati identificati 129 geni sovraespressi nelle cellule sottoposte a stress per 24 ore (*shock up*), 337 geni sovraespressi nelle cellule adattate (adattamento *up*), 174 geni sottoregolati in risposta a condizioni di *shock* (*shock down*) e 415 geni sottoregolati nell'adattamento indotto alle colture cellulari (adattamento *down*). I risultati complessivi degli esperimenti *microarray*, per ciascuna categoria di espressione, sono riportati nelle tabelle supplementari (TS 1-4) in calce alla tesi. Le annotazioni riportate nelle suddette tabelle sono state aggiornate (Ottobre 2008) mediante allineamenti delle sequenze nelle banche dati nucleotidiche (NCBI, TAIR, TIGR) e amminoacidiche (UniProt, SwissProt) sia di patata che di altre specie vegetali. Nelle tabelle i geni sono annotati in base all'omologia con sequenze note e classificati nelle categorie funzionali previste dal catalogo *FunCat* (Ruepp et al., 2004); sono, inoltre, evidenziati in verde i geni sottoposti a verifica mediante qRT-PCR (cfr. paragrafo 3.2).

La distribuzione percentuale delle diverse categorie funzionali identificate mediante analisi *microarray* è rappresentata nella Fig. 6A-D. Dai risultati ottenuti emerge che una percentuale significativa, dal 31% al 47%, dei geni regolati da stress idrico in patata consiste di sequenze classificate come *unknown*, termine con cui sono stati indicati i geni che non mostrano omologie significative con sequenze presenti in banca dati; inoltre, alcuni geni (dal 3 al 5 %) non hanno una classificazione ben definita ovvero non presentano funzioni assegnate o sperimentalmente dimostrate.

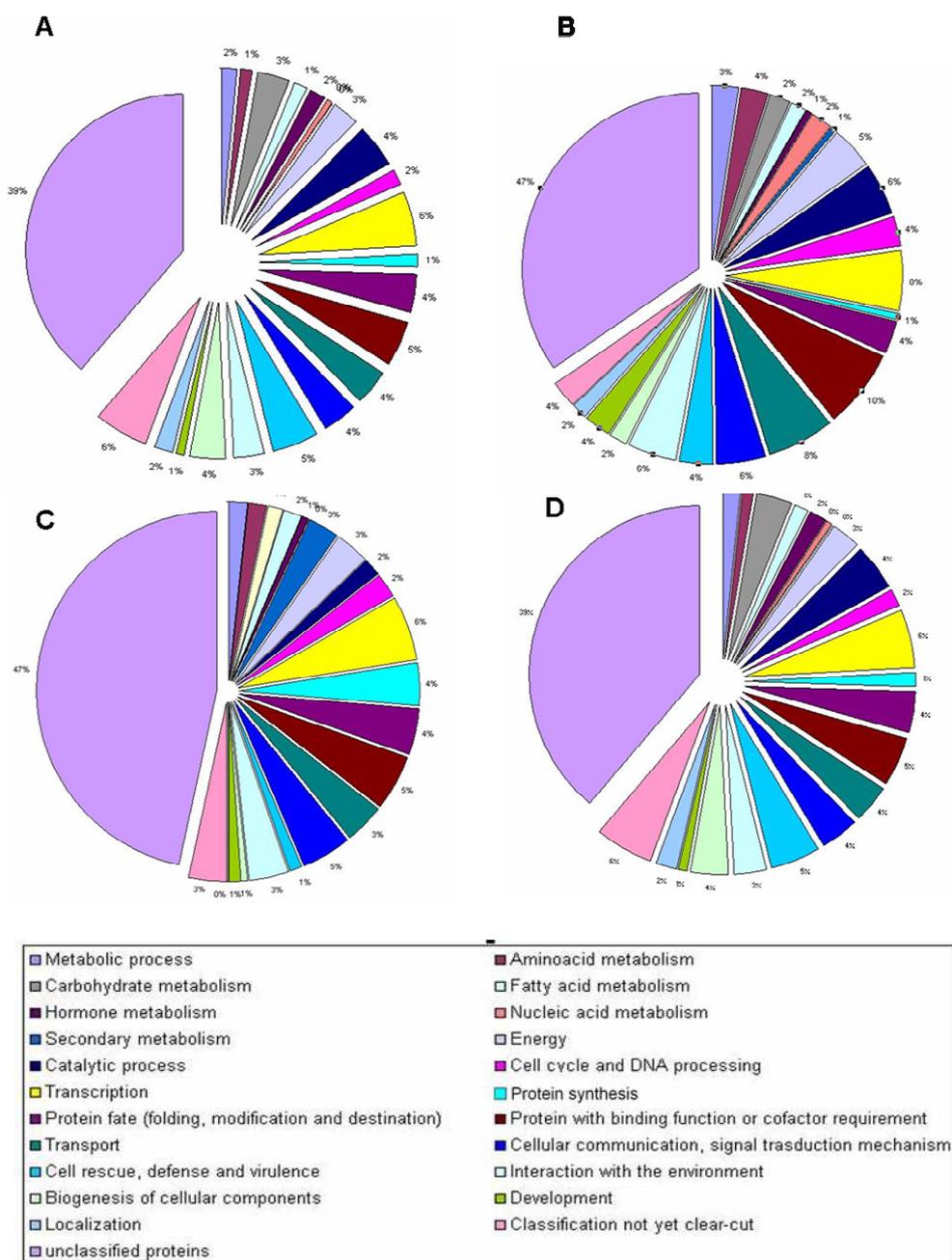


Figura 6. Rappresentazione grafica dei geni *up*-regolati e *down*-regolati in colture cellulari raggruppati per categorie funzionali. (A) Geni sovraespressi in condizioni di *shock*. (B) Geni sovraespressi in condizioni di adattamento. (C) Geni repressi in condizioni di *shock*. (D) Geni repressi in condizioni di adattamento.

Le principali categorie geniche individuate sono riportate in Fig. 2. Dai risultati dell'analisi, si evidenzia che una delle classi funzionali la cui espressione risulta maggiormente modificata in condizioni di stress è quella dei geni coinvolti nei processi di trascrizione; in particolare in condizioni di *shock* sono risultati significativamente up-regolati almeno 10 geni coinvolti nella regolazione tra cui fattori trascrizionali (FT) quali COL1 (*costans-like1*, BQ511758), *gigantea* (BQ510464), SCL1 (*scarecrow*, BQ510154) ed un fattore trascrizionale della famiglia MYB (BQ514240). L'espressione di FT del tipo AT-HSFA6B (BQ511608), AT-HSFB4 (BQ505416) e due fattori trascrizionali del tipo *zinc finger* (BQ120740, BQ506871), invece, è risultata repressa in condizioni di *shock* idrico. Tra gli FT sovraespressi in condizioni di adattamento sono stati identificati ARF10 (BQ112621), GBF3 (BQ514015), STOP1 (BQ507958), TINY (BQ115125) e WRKY40 che ha mostrato uno dei livelli di induzione più elevati (oltre 25 volte up-regolato). In condizioni di *shock* numerosi trascritti coinvolti nella sintesi proteica sono risultati repressi, tra cui geni codificanti per proteine ribosomiali del tipo RPS3C (BQ509785), RPP3B (BQ117876), RPL10aB (BQ119025) e un gene codificante per il fattore di elongazione del tipo eIF4-gamma (BQ117807). Un consistente numero di geni coinvolti nella risposta a stress è risultato differenzialmente regolato nelle due popolazioni cellulari. In particolare in cellule esposte a condizioni di *shock* idrico sono risultati indotti geni codificanti per una glutatione s-transferasi (AtGSTU8, BQ510856) e per una proteina di legame al DNA (AtTRP1, BQ519197; BQ510856). In colture cellulari adattate sono risultati sovraespressi numerosi geni *stress-responsive* tra cui *los2*, *phs1*, *rcy1*, *tga3*; *osm34* inoltre sono risultati indotti geni tipicamente coinvolti nella risposta a stress biotici tra cui differenti trascritti codificanti per proteine "disease resistance" (BQ513155, BQ518444, BQ512657, 518456, BQ516148), per inibitori di proteasi (BQ515885) e per chitinosi (BQ518165).

Dall'analisi complessiva dei dati solo nove geni, codificanti per una *aldo/keto reductase*, una *lipase/hydrolase*, una proteina coinvolta nelle divisioni cellulari (CDC48), una proteina della famiglia delle trasducine, una proteina *carrier* mitocondriale, una proteina del tipo *lectin kinase*, una proteina di difesa del tipo *NBS-LRR*, una proteina contenente il dominio tetratricopeptide e per una proteina *heat shock 81-2* sono risultati significativamente sovraespressi sia nelle cellule adattate che in quelle stressate (condizioni *shock*); sei EST codificanti per una *alanine transaminase*, una proteina della famiglia RCC1, una *DNA translocase*, una *zinc finger del tipo DHHC*, una *zinc finger del tipo C3HC4-RING* ed una *Glutathione S-transferase* sono risultati, invece, similmente repressi nelle due popolazioni cellulari rispetto alle cellule controllo.

3.1.1 Validazione dei dati microarray e studio di espressione genica in cellule di *S. tuberosum*

In base ai risultati dell'analisi trascrittomico è stato selezionato un gruppo rappresentativo di *EST* da sottoporre a successivo studio di espressione.

Al fine di confermare i dati di espressione genica ottenuti dall'analisi *microarray* è stato estratto l'RNA totale dalle tre popolazioni cellulari di *S. tuberosum*. Sull'RNA estratto è stata condotta un'analisi dei livelli di espressione di 25 geni selezionati mediante *Real Time PCR* (qRT-PCR) (Fig.7). Per l'amplificazione di ogni singola EST sono state disegnate coppie di *primer* interni alla sequenza EST spottata sul

vetrino in modo da ottenere ampliconi di lunghezza compresa tra 100 e 150 bp (Tabella 1).

Come controlli interni per la normalizzazione dei dati di espressione sono stati testati diversi geni costitutivi (actina, gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, ubiquitina, tubulina, fattore di elongazione 1-alfa, rRNA 18S). Il ribosomiale 18S è risultato costitutivamente espresso in modo stabile nelle popolazioni cellulari utilizzate, mentre gli altri putativi geni *housekeeping* hanno mostrato profili di espressione alterati nelle nostre condizioni sperimentali. I dati di espressione sono stati ottenuti da almeno 2 esperimenti indipendenti con tre repliche ciascuno.

I geni codificanti per una *defective Kernel1* (*dek1*), per una subunità della RNA polimerasi II (*rbp10*) e per una *GTP-binding protein* hanno mostrato in assoluto i maggiori incrementi di espressione in riferimento alle cellule controllo. Il gene, invece, codificante per una *14*3*3 protein* ha mostrato una forte induzione in cellule adattate allo stress idrico. Molte EST presentano un profilo di espressione differenziale nei due trattamenti. In particolare, i geni codificanti per una *sucrose synthase*, una *catalase*, un *ABC transporter*, una *F-box protein* ed un canale ionico (*cation exchanger2*) sono risultati indotti esclusivamente in risposta a condizioni di *shock*. L'espressione di questi ultimi in cellule adattate è risultata simile al controllo o talvolta essi risultano repressi. L'analisi di PCR quantitativa ha mostrato che alcuni geni sono repressi in entrambe le popolazioni cellulari (*atgb2*, una proteina ribosomiale 40S e una proteina contenente un *rhodanese-domain*). In ultimo i geni codificanti per una *RNA-binding* (*rgga*) e per una proteina *Heat shock 81-2* (*hsp81-2*) sono sovraespressi in cellule adattate, ma presentano un profilo di espressione invariato nelle cellule sottoposte a *shock* idrico.

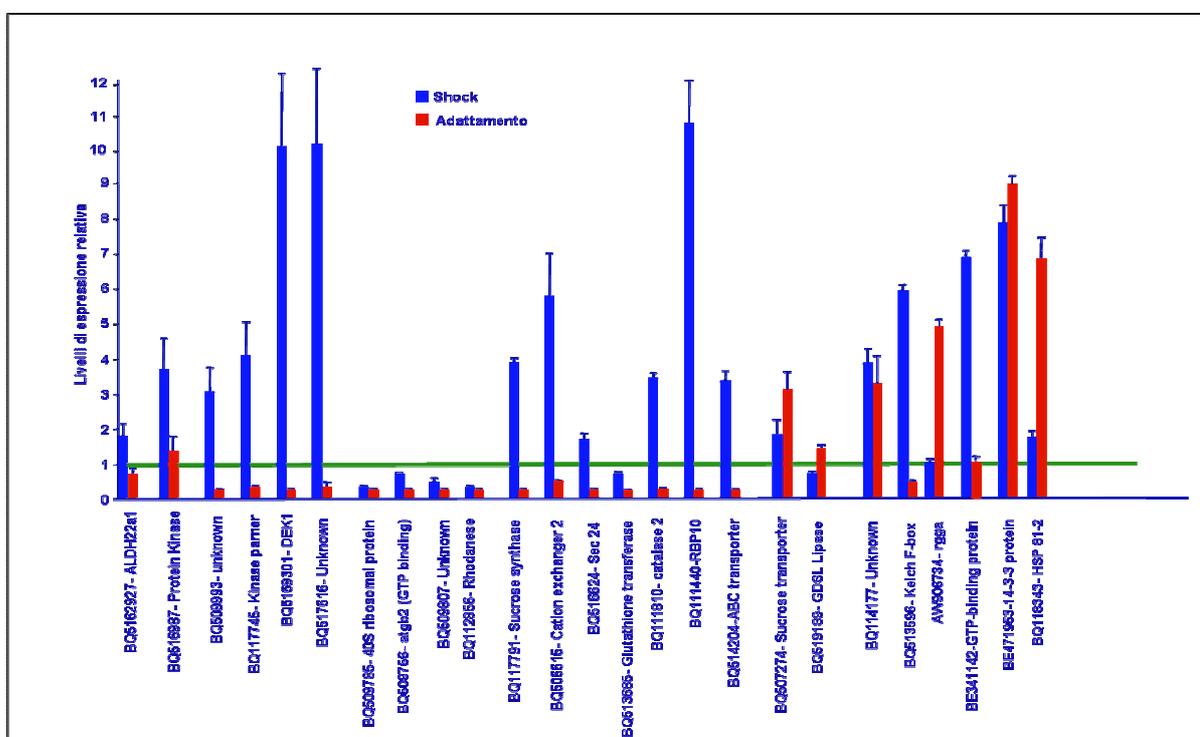


Figura 7. Studio di espressione di 25 geni in cellule di patata esposte a stress idrico mediante qRT-PCR. L'rRNA ribosomiale 18S è stato utilizzato come controllo endogeno della reazione. In rosso sono riportati i profili di espressione in cellule adattate allo stress, in blu è riportato il profilo di espressione in

cellule sottoposte a *shock* idrico. La linea verde rappresenta il livello di espressione di ogni gene in cellule mantenute in condizioni controllo.

3.1.2 Studio del profilo di espressione di geni coinvolti nello stress idrico in tessuti di patata

Dall'analisi preliminare di conferma riportata sopra, i profili di espressione di 25 geni studiati tramite qRT-PCR hanno quindi confermato il dato dei *microarray* indicando che i geni sono regolati da deficit idrico di breve e lungo termine. Ulteriori esperimenti sono stati condotti per approfondire il coinvolgimento dei geni identificati nei meccanismi di risposta alla carenza idrica; l'espressione di alcuni trascritti rappresentativi è stata analizzata mediante analisi quantitativa qRT-PCR in piante adulte di patata esposte a stress idrico.

Piante di patata di quattro settimane (cv. Desirée) sono state sottoposte a stress da carenza idrica per 7 giorni. L'incremento del valore della resistenza stomatica misurato al termine del trattamento ha confermato la reale intensità dello stress imposto (Fig. 8)

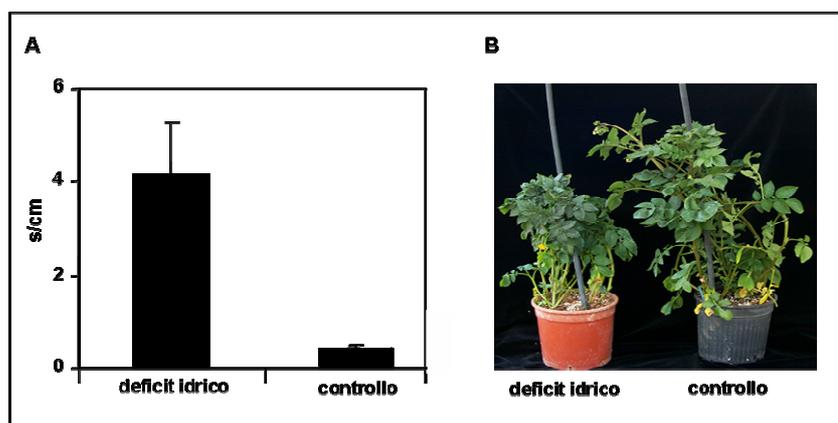


Figura 8. Valutazione dello stress idrico in piante di *S. tuberosum* (cv. Desiree). (A) Misura di resistenza stomatica in piante di 4 settimane sottoposte a deficit idrico per sette giorni ed in piante mantenute in regime idrico regolare. (B) fenotipo delle piante in condizioni controllo e di stress idrico.

Il gene costitutivo *ef-1alfa* è stato impiegato negli esperimenti di Real Time PCR come gene house-keeping della reazione. In figura A e B sono riportati i profili di espressione dei geni selezionati è stato studiato in foglie e radici di piante di patata in condizioni controllo ed in presenza di stress idrico (Fig. 9, A-B). In particolare tre geni codificanti per una proteina chinasi (BQ516987), per una saccarosio sintasi (BQ117791) e per un canale ionico (BQ506615) hanno mostrato elevati livelli di sovraespressione in foglie, rispettivamente di 41, 25 e 39 volte superiore ai livelli di espressione nelle foglie di piante allevate in condizioni controllo. Inoltre, geni codificanti per una subunità delle RNA polimerasi (I, II, e III, RBP10), per una catalasi, una proteina SEC34, per una proteina GTP-binding, per una proteina RNA-binding ed un gene *unknown* risultano significativamente indotti in presenza di stress idrico. Pochi geni, invece, tra i quali le EST BQ514204 e BQ519189 codificanti rispettivamente per un trasportatore ABC ed una lipasi sono risultati repressi in foglie di patata allevate in condizioni di scarsa disponibilità di acqua.

Solo tre geni codificanti per la proteina chinasi (BQ516987), per il canale ionico (BQ506615) e per la proteina RNA-binding (AW906734) sono risultati indotti in radici di piante di patata in condizioni di stress idrico.

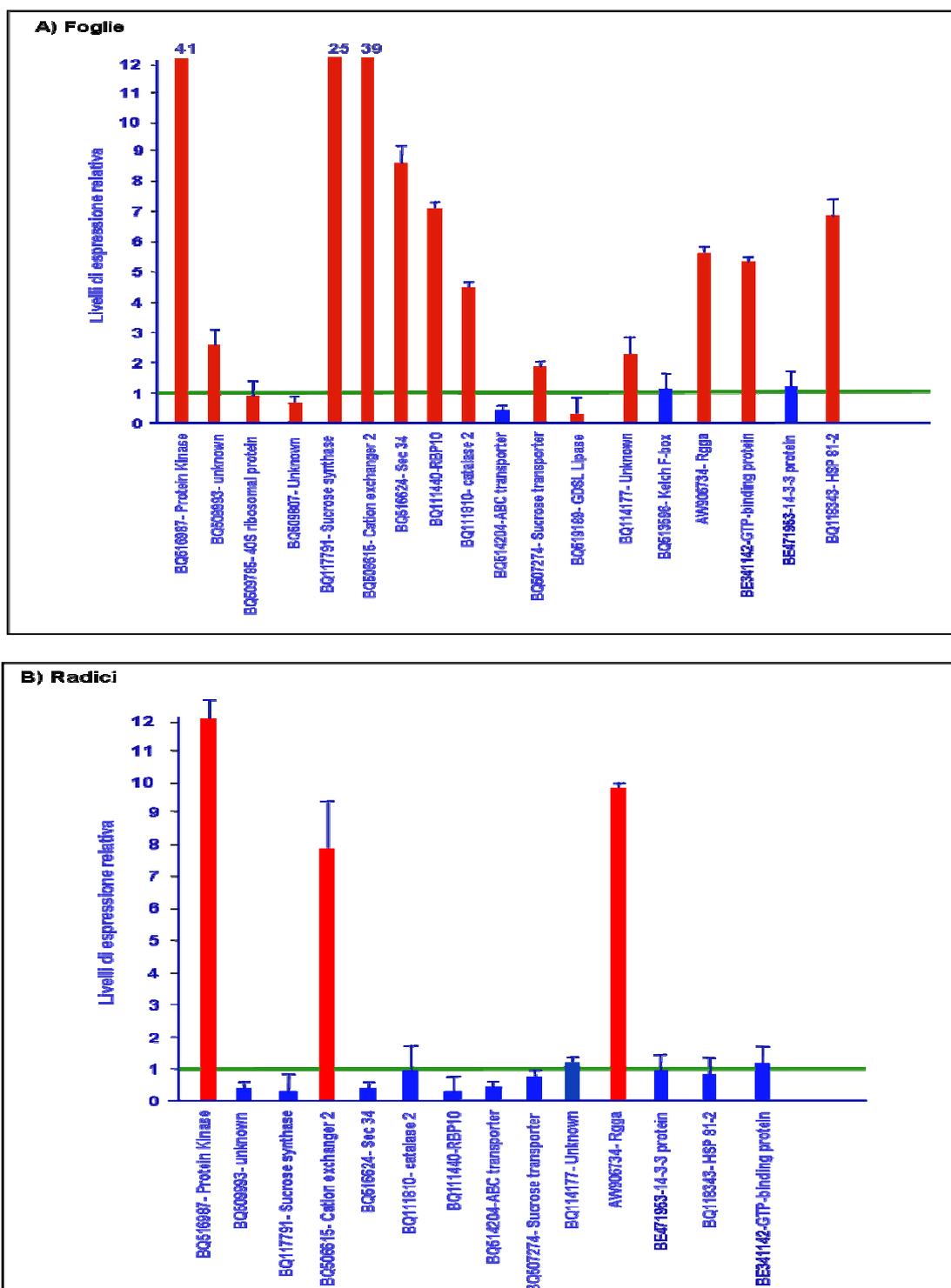


Figura 9. Studio di espressione di diversi geni in foglie e radici di patata esposte a stress idrico. Il profilo di espressione di geni rappresentativi identificati nell'analisi *microarray* è stato studiato mediante qRT-PCR. Il gene costitutivo codificante per l'elongation factor 1-alfa è stato utilizzato come controllo endogeno della reazione. In rosso sono riportati i geni che confermano il profilo di espressione riportato in cellule di patata, in blu sono riportati i geni che non confermano tale profilo. La linea verde continua rappresenta il livello di espressione del singolo gene nel campione non stressato.

3.2 Caratterizzazione in silico ed isolamento del gene codificante per una RNA-binding in patata

Uno dei geni con profilo di espressione di maggiore rilievo è *rgga*. Il Tentative Consensus (TC170986) di *rgga* presenta omologie con il gene *sato2* (Q711N4), codificante per una proteina di *B. vulgaris* in grado di conferire resistenza al sale in lievito (Ros et al., non pubblicato). Questa caratteristica rende il gene *rgga* di particolare interesse per un approfondimento sulla putativa funzione nei meccanismi di risposta a stress nelle piante.

La sequenza della EST AW906734 spottata sul vetrino *microarray* copre 495 bp del TC170986 di 1786 bp costituito da 7 EST, includendo alcune sequenze isolate da librerie cDNA di tessuti sottoposti a stress abiotici differenti (Fig. 10)

La sequenza *consensus* del TC, seppure incompleta, presenta a livello amminoacidico una omologia del 96% con una proteina RNA-binding (Q0GH11) di *Capsicum annuum* di 360 amminoacidi.

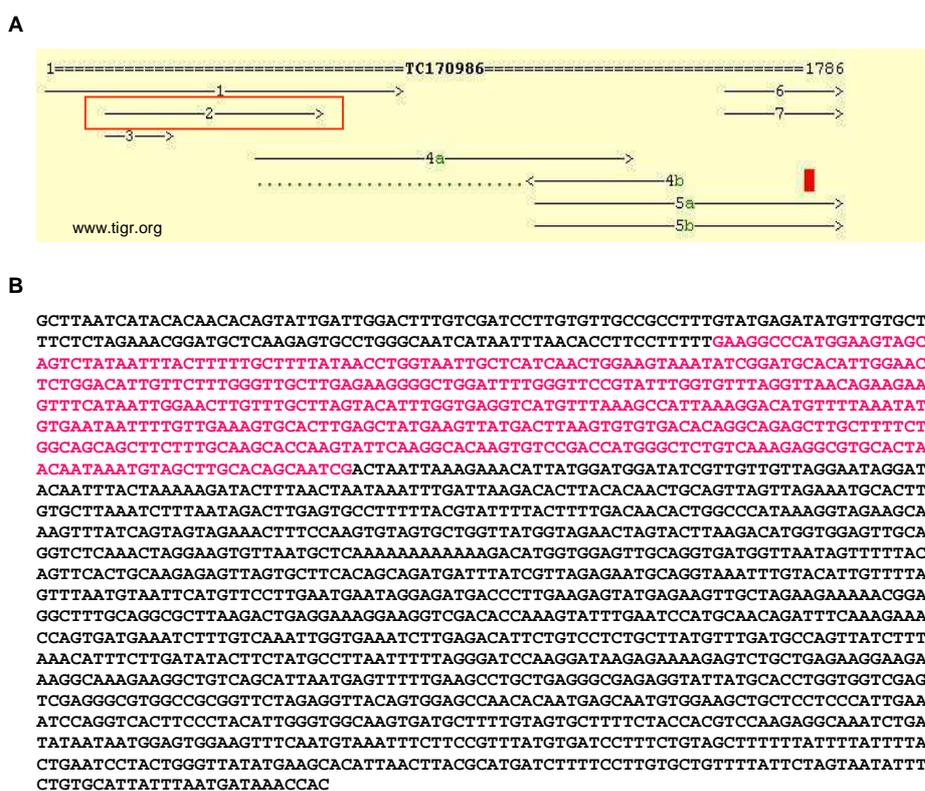


Figura 10. Tentative Consensus di patata del gene *rgga* (TC170986). (A) Schema del TC assemblato per ricostruire la sequenza codificante del gene *rgga* depositato nella banca dati del TIGR; nella box rossa è evidenziata la posizione della EST AW906734 spottata sul vetrino *microarray*. (B) Sequenza completa del TC, in rosso è evidenziata la sequenza della EST AW906734.

Al fine di isolare la sequenza codificante completa (CDS) del gene *rgga*, sono state ricercate omologie significative in banca dati attraverso l'algoritmo BLAST. Il clone BT014404.1 di pomodoro ha mostrato una omologia del 99% al tentative Consensus

170986 Mediante l'utilizzo del software ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/orf/>), è stato possibile identificare una *Open Reading Frame* (ORF) all'interno del clone di pomodoro. L'RNA totale di patata è stato retrotrascritto ed utilizzato come template nella reazione PCR utilizzando *primer* disegnati sulla sequenza di pomodoro; la putativa CDS di patata è stata clonata nel vettore *Gateway* pDONR207 e successivamente sequenziata. La sequenza ottenuta, confermata in entrambe le direzioni sulle due eliche di DNA, è stata depositata nella banca dati di sequenze nucleotidiche EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) (Fig. 11).

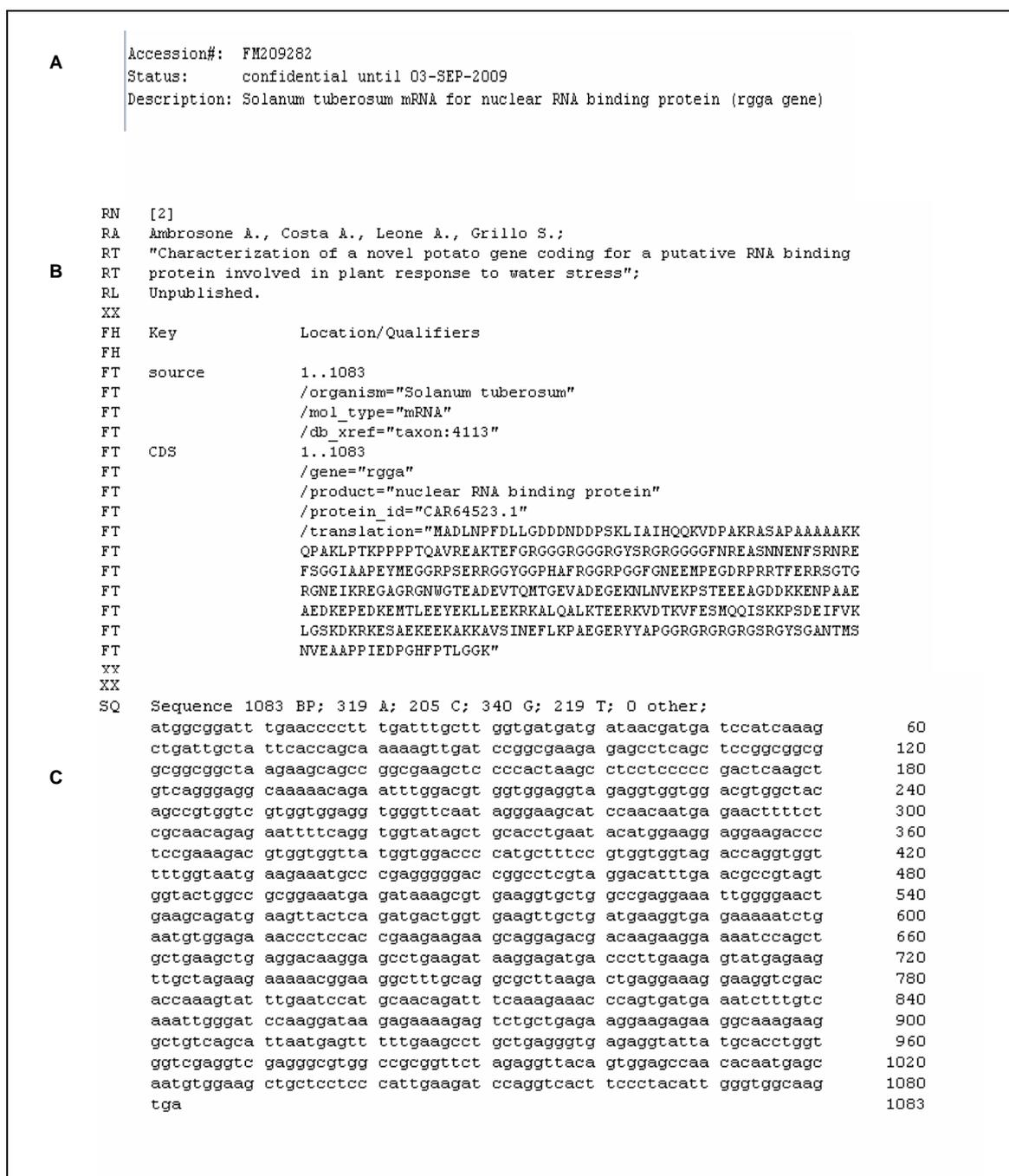


Figura 11. Sequenza codificante del gene *rgga* di *S. tuberosum*. (A) *Accession number* definito dalla banca dati EMBL. (B) Sequenza amminoacidica depositata. (C) Regione codificante completa del gene di patata.

L'analisi della sequenza di patata evidenzia che il gene *rgga* è composto da 1083 nucleotidi codificanti una proteina di 356 amminoacidi. Una analisi di sequenza amminoacidica effettuata mediante il software BLASTP ha rivelato che la proteina è molto conservata in specie diverse presentando omologie in *Oryza sativa*, *Beta vulgaris*, *Vicia faba* e *Arabidopsis thaliana* (Fig. 12).

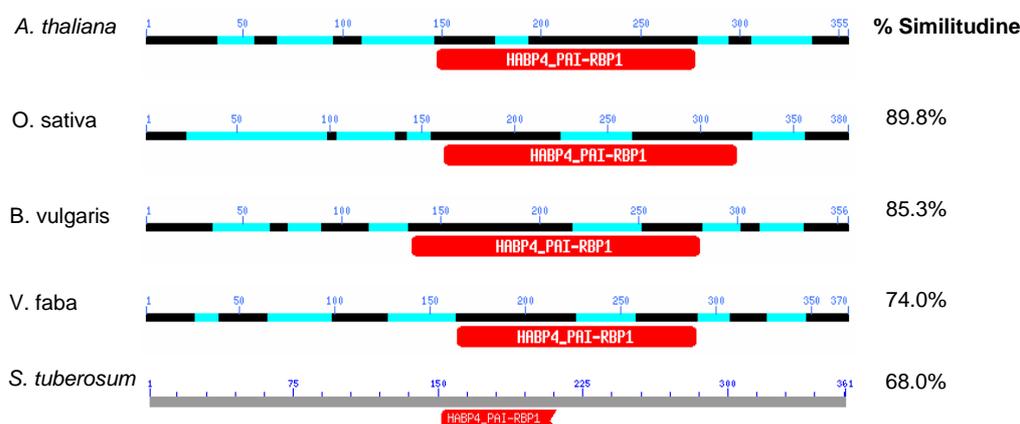


Figura 12. Caratterizzazione in silico della proteina RGA. Allineamento ed omologie di sequenza amminoacidica mediante l'algoritmo BLAST. In rosso è indicato il dominio *Hyaluronan/mRNA binding* (InterPro:IPR006861).

3.3 Studio funzionale del gene *rgga* in *Arabidopsis thaliana*

Il gene codificante per la proteina *RNA-binding* è stato oggetto di una più approfondita analisi in *A. thaliana*. l'organismo vegetale modello maggiormente caratterizzato e per il quale sono disponibili validi strumenti di analisi di genomica strutturale e funzionale (sequenza completa del genoma, archivi di dati di espressione genica, collezioni di mutanti, etc.). Inoltre, la versatilità con la quale questo organismo vegetale si presta alla trasformazione genetica consente di generare con facilità di piante transgeniche, indispensabili al fine di studiare e comprendere il ruolo funzionale di *rgga*.

3.3.1 Analisi bioinformatica

Al fine di caratterizzare il gene ortologo *rgga* in *A. thaliana* è stata effettuata una dettagliata analisi bioinformatica. In *Arabidopsis* il gene omologo si trova nel locus At4g16830, si estende per 2156 basi con una regione 5'UTR di 183 bp, 7 esoni, e un 3'UTR di circa 285 bp. Il gene codifica per una proteina *RNA-binding* (RGA) di 356 aa localizzata nel nucleo e nel citosol con un ruolo biologico sconosciuto. La proteina contiene due caratteristiche regioni ricche in glicina (Fig. 13) in cui prevalgono delle tipiche ripetizioni di Arginina-Glicina (RGG box) da cui il nome del gene.

```

1  MATLNPFDLL  DDDAEDPSQL  AVAIEKIDKS  KKSGQVSSLP  AKSAPKLPSK
51  PLPPAQAVRE  ARSDAPRGGG  GRGGFNRRGR  GYNRDDGNNG  YSGGYTKPSG
101 EGDVSKSSYE  RRGGGGAPRG  SFRGEGGGPG  GGRRGGFSNE  GGDGERPRRA
151 FERRSGTGRG  SDFKRDGSGR  GNWGTPEEEI  AAETEAVAGV  ETEKDVGEKP
201 AVDDVAADAN  KEDTVVEEKE  PEDKEMTLDE  YEKILEEKKK  ALQSLTTSER
251 KVDTKVFESM  QQLSNKKSND  EIFIKLGS DKRDKDKEEK  AKKAVSINEF
301 LKPAEGGNY  RGGRRGRGRG  GRGRGGVSSG  ESGGYRNEAA  PAIGDAAQFP
351 SLGGK

```

Figura 13. Sequenza amminoacidica della proteina RGA di *Arabidopsis*. In Blu (aa 66-177 e aa 306-334) sono rappresentate 2 caratteristiche regioni ricche in glicina (RGG box).

Lo studio *in silico* della regione del promotore di 1500 bp a monte dell'ATG è stato effettuato con il tool di predizione Athena (<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>); tale analisi ha evidenziato la presenza di motivi di legame a fattori di trascrizione del tipo MYB4 ed un *core motif* DRE (Dehydration-Responsive Element) (Fig. 14).

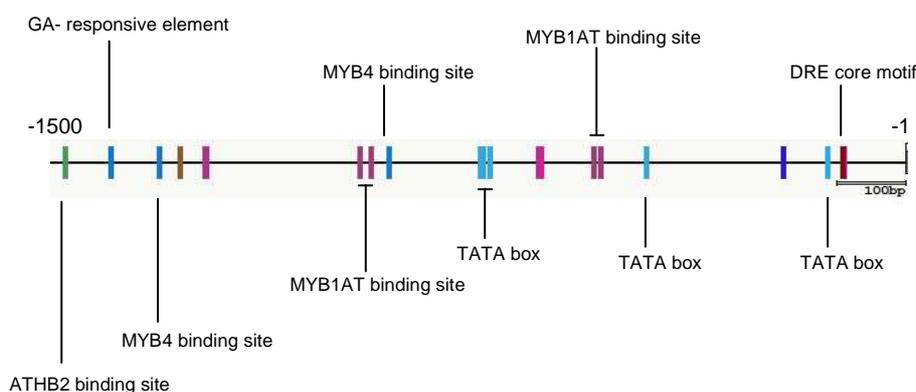


Figura 14. Caratterizzazione *in silico* del promotore del gene *rga* mediante software ATHENA. Circa 1500 bp a monte del gene *rga* sono state analizzate per la presenza di sequenze di legame a fattori trascrizionali e per domini di regolazione.

3.3.2 Analisi di espressione in risposta a stress abiotici

Il profilo di espressione del gene At4g16830 è stato valutato mediante qRT-PCR in colture cellulari di *A. thaliana* (Fig.11). Popolazioni cellulari della linea *MM2d* ecotipo *Landsberg erecta*, disponibili presso il CNR-IGV di Portici, sono state sottoposte a diversi trattamenti da stress. In particolare la coltura cellulare è stata trasferita per 24 ore in substrati liquidi contenenti 150 mM di NaCl, 50 μ M ABA e 10% PEG. Lo stress indotto da sale ha determinato una marcata riduzione di vitalità (circa 40 %), mentre il trattamento con l'ABA e con il PEG hanno presentato un effetto cito-tossico più blanda (Fig. 15A)

L'analisi qRT-PCR ha rivelato che il gene At4g16830 è risultato sovraespresso in tutti i trattamenti imposti; in particolare, esso risulta indotto rispetto al controllo cinque, sei ed otto volte in cellule trattate con ABA, PEG ed NaCl, rispettivamente (Fig. 15B).

L'espressione del gene *rgga* è stata ulteriormente studiata in giovani piantine di *A. thaliana* allevati in vitro ed esposti a differenti concentrazioni di NaCl per 24h. L'rRNA ribosomiale è stato utilizzato come controllo endogeno della reazione. L'analisi qRT-PCR ha rivelato che *rgga* non altera il proprio profilo di espressione per breve tempo (24 ore) in *seedling* esposti ad alte concentrazioni saline (Fig. 16A). Il gene *rd29a*, inducibile da stress (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000), è stato utilizzato come *marker* dello stress (Fig. 16B).

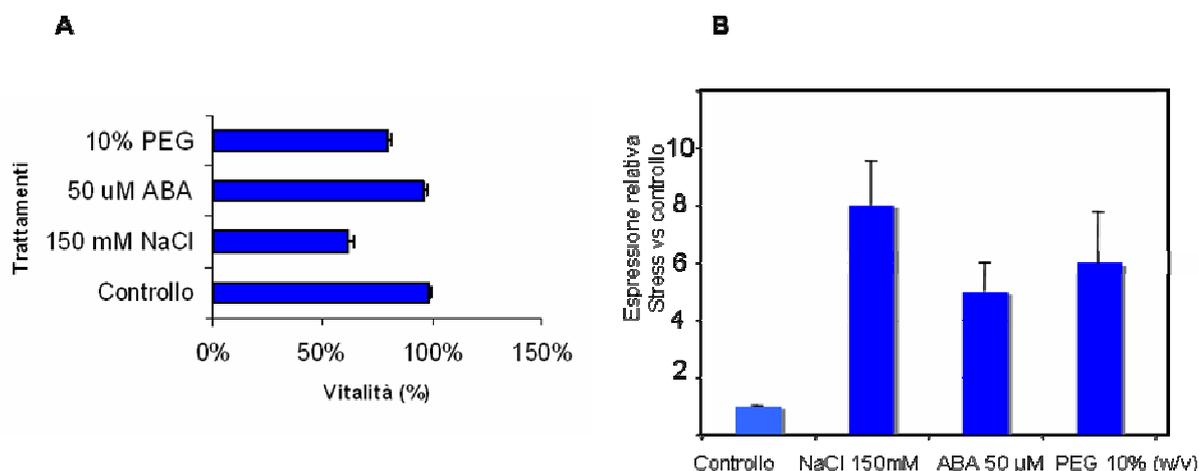


Figura 15. Espressione del gene *rgga* in colture cellulari di *A. thaliana* in risposta a differenti trattamenti da stress. (A) Vitalità cellulare dopo 24 ore di trattamento. (B) Analisi di espressione mediante qRT-PCR in colture cellulari esposte a 150 mM NaCl, 50 μM ABA e 10 % PEG. L'rRNA ribosomiale 18S è stato utilizzato come controllo endogeno della reazione.

Al fine di definire il coinvolgimento di *rgga* nello stress di lungo periodo piantine di *arabidopsis* di 14 giorni allevate in vitro sono state trasferite su substrato GM solido contenente 120 mM NaCl, 5 μM ABA oppure su piastre saturate con una soluzione di PEG al 35% (w/v). L'analisi Northern evidenzia che l'espressione del gene è indotta da condizioni di stress salino ed osmotico (Fig. 16C).

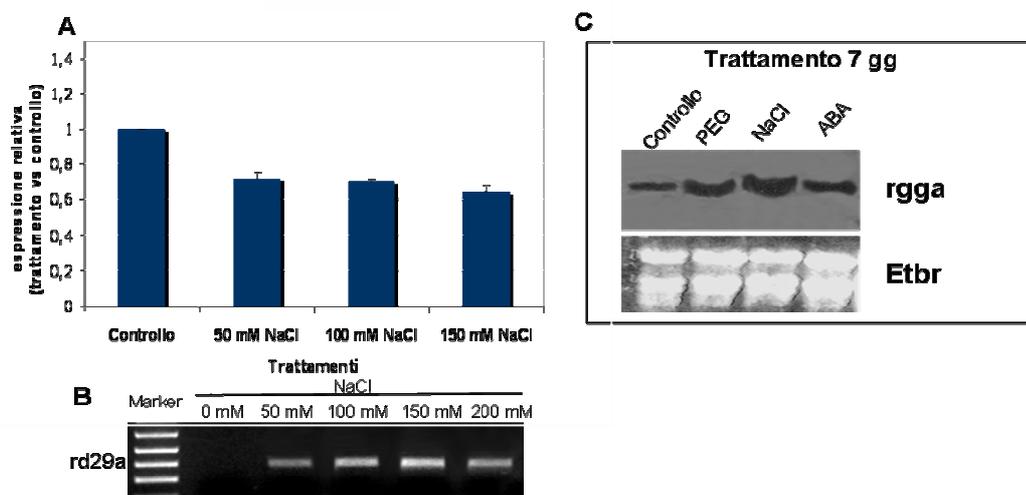


Figura 16. Espressione del gene *rgga* in giovani piante di 14 giorni di *A. thaliana*. (A) Analisi qRT-PCR per il gene *rgga* in risposta a diverse concentrazioni di NaCl dopo 24 ore di trattamento. (B)

Analisi di espressione mediante RT-PCR del gene marker *rd29a* indotto da condizioni di stress osmotico. (C) Studio dell'espressione di *rgga* mediante Northern blotting in risposta a trattamenti di 7 giorni.

3.3.3 Attività del promotore del gene *rgga*

Al fine di studiare l'espressione del gene *rgga* nei diversi tessuti e nei diversi stadi di sviluppo in piante di *A. thaliana*, il gene reporter *GUS* è stato clonato sotto il controllo del promotore endogeno di *rgga*. La regione di 2 kb del promotore, a monte del codone di inizio, è stata amplificata, con due oligonucleotidi specifici, da DNA genomico estratto da piante di *A. thaliana* (Col-0); l'amplicone è stato clonato mediante sistema *Gateway* nel vettore pDONR207 (www.invitrogen.com). Dopo sequenziamento, il plasmide pDONR207 contenente il promotore di *rgga* è stato utilizzato nella reazione gateway LR trasferendo la sequenza regolatrice a monte del gene *GUS* nel vettore binario pMDC164 (Curtis and Grossnicklaus, 2003) (Fig. 17A-B).

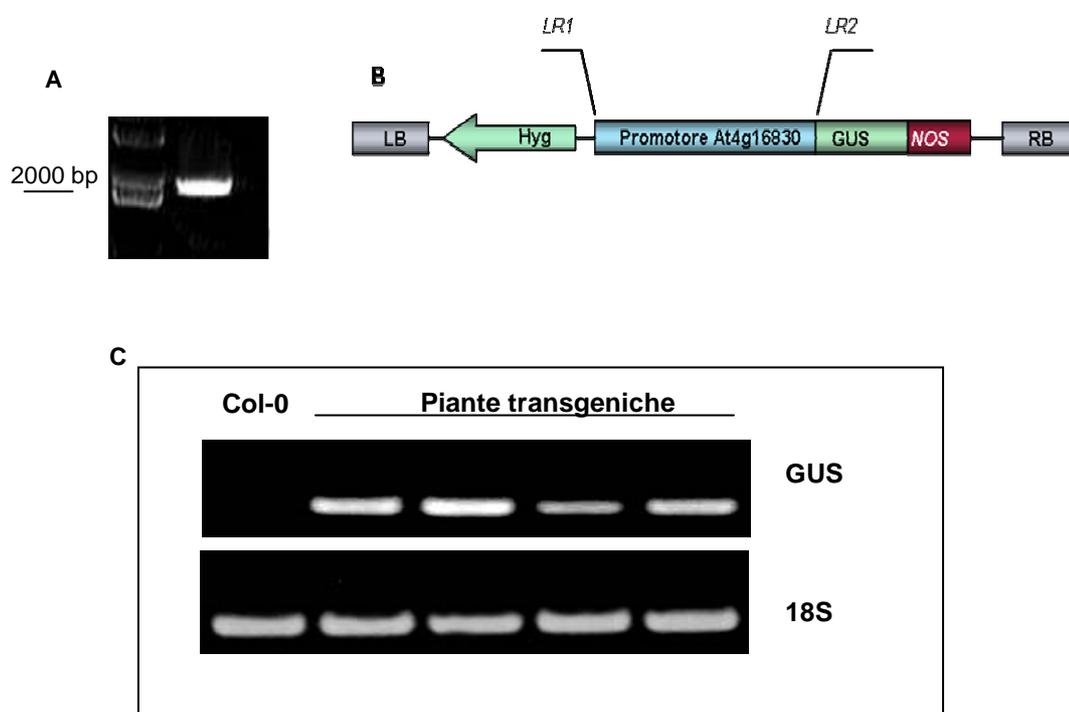


Figura 17. Clonaggio del promotore del gene *rgga* e produzione di piante transgeniche. (A) Amplificazione del frammento di 2000 bp corrispondente al promotore del gene At4g16830 mediante PCR su DNA genomico di Col-0. (B) Rappresentazione schematica del plasmide binario pMDC164 contenente il promotore di *rgga*. (C) Caratterizzazione molecolare di piante transgeniche trasformate con il vettore rappresentato in B.

Il plasmide ricombinante ottenuto è stato, quindi, usato per l'espressione stabile in *A. thaliana*, mediante trasformazione via *A. tumefaciens*. Le piante, selezionate su terreno contenente igromicina, sono state analizzate per la presenza del gene *gus* tramite PCR (Fig. 17C); in particolare, piante *rgga*:GUS della generazione T3 sono state utilizzate per lo studio dell'espressione del promotore mediante analisi del gene reporter *gus* nei vari tessuti vegetali. Piante di *A. thaliana* trasformate con il vettore

binario pBIN contenente il gene *gus*, sotto il controllo del promotore costitutivo 35S, sono state utilizzate come controllo.

Seedling di 7 giorni omozigoti per singola inserzione della cassetta di espressione promotore *rgga::GUS* sono state incubate in presenza del substrato *X-gluc* per tempi diversi. Dopo 2 ore di incubazione l'espressione del gene GUS ha indicato una forte attività del promotore a livello della radice ed in particolare nei fasci vascolari. Tempi di incubazione prolungati (4-8 ore) hanno, invece, mostrato una colorazione diffusa anche nei cotiledoni ad indicare che *rgga* è attivamente espresso in maniera costitutiva in piantine di 7 giorni (Fig.18).

Il saggio istochimico GUS, eseguito in piante adulte di sei settimane, ha evidenziato un'intensa attività del gene reporter *GUS* nei fasci vascolari di foglie caulinari.

Una più attenta osservazione al microscopio DIC (*Differential Interference Contrast*) ha mostrato una colorazione specifica nelle cellule di guardia degli stomi sulla pagina adassiale di foglie del caule.

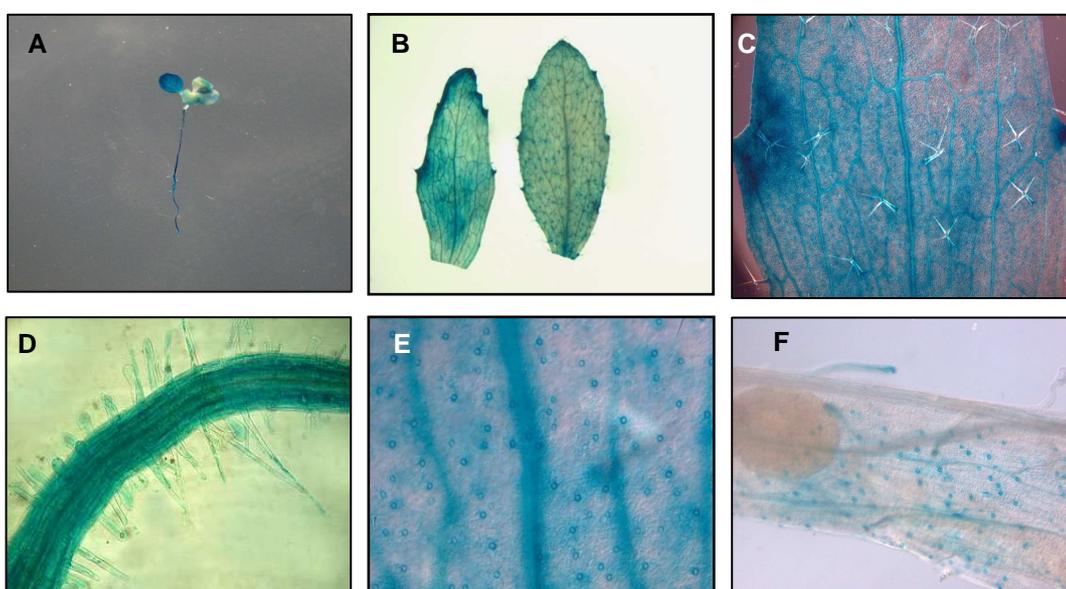


Figura 18. Localizzazione istochimica dell'attività del promotore del gene *rgga* in organi e tessuti vegetativi di piante transgeniche di *A. thaliana*. (A) *Seedling* di 5 giorni. (B) Foglie del caule. (C) Particolare fasci vascolari. (D) Radice primaria. (E) Dettaglio della foglia: pagina adassiale con stomi. (F) Stomi

E' stata effettuata, inoltre, un' attenta analisi di espressione nel fiore, nelle silique e nei principali organi e tessuti riproduttivi. Le osservazioni, effettuate al microscopio DIC hanno evidenziato una debole attività del promotore *rgga* nei petali ed una attività più accentuata nei sepali. Nelle silique mature è stata osservata una blanda colorazione istochimica su entrambe le valve; il particolare proposto nella Fig. 19C rivela la colorazione del filamento del reple e l'assenza di attività del promotore *rgga* in semi di *A. thaliana*. Nessuna colorazione è stata osservata, inoltre, nel filamento dello stame e nelle antere, al contrario i pollini fuoriusciti dalle teche hanno presentato una intensa colorazione istochimica. L'osservazione dello stigma non ha rivelato attività del promotore *rgga* a livello di papille, ma una colorazione istochimica si presenta nei fasci che innervano la parte basale dello stigma. Nella figura 19F si evidenzia l'assenza di espressione del gene GUS nell'ovario.

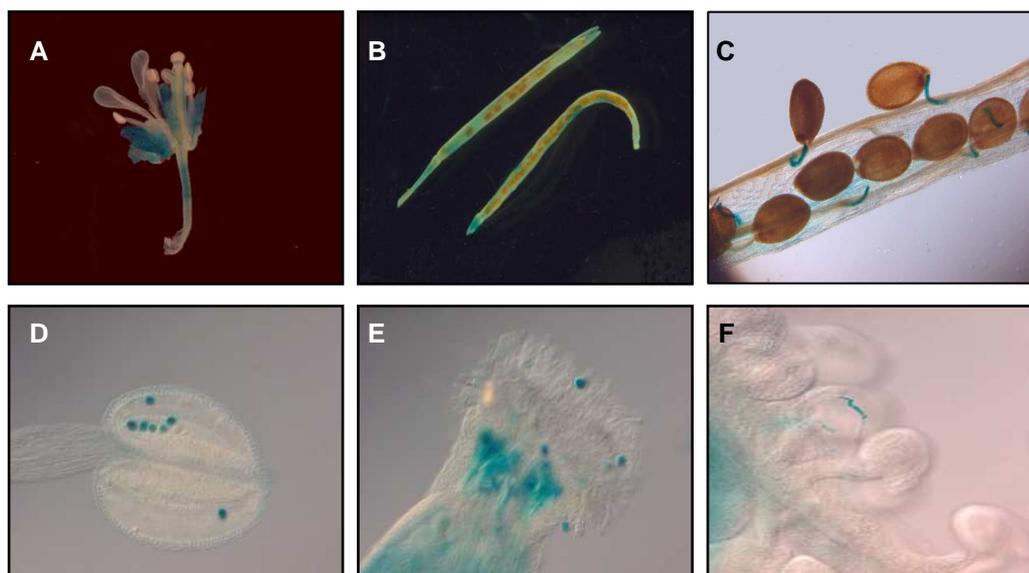


Figura 19. Localizzazione istochimica dell'attività del promotore del gene *rgga* in organi e tessuti riproduttivi di piante transgeniche di *A. thaliana*. (A) Fiore. (B) Silique. (C) Semi. (D) Antera e polline. (E) Stigma. (F) Ovario.

3.3.4 Localizzazione della proteina di fusione RGGA::YFP

E' ormai evidente che studi di localizzazione proteica a livello tissutale, cellulare e subcellulare forniscono valide informazioni nello studio del ruolo biologico di geni di interesse. Al fine di determinare la localizzazione di RGGA, la proteina di fusione *RGGA::YFP* è stato stabilmente espressa in piante di *A. thaliana*.

La sequenza codificante di *rgga* clonata nel vettore pDONR207 è stata trasferita, mediante la reazione gateway LR, nei vettori di espressione pEG (Earley et al., 2006) (Fig.20). In particolare la sequenza di *rgga* è stata fusa *in frame* all'estremità N-terminale ed all'estremità C-terminale della sequenza codificante la proteina YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV35S. La cassetta d'espressione chimerica è stata introdotta stabilmente nel genoma di piante di *A. thaliana* mediante trasformazione via *A. tumefaciens*. L'analisi *western blotting*, con anticorpo anti-GFP, ha evidenziato, nelle linee trasformate con i costrutti pEG101 e pEG104, una proteina di circa 70 kDa che corrisponde al peso molecolare atteso della proteina di fusione *RGGA::YFP* (Fig. 20 A-B). Piantine di quattro giorni di 5 differenti linee transgeniche sono state analizzate al microscopio confocale per lo studio di localizzazione della proteina di fusione. Linee di *A. thaliana* trasformate con il vettore vuoto e piante esprimenti la proteina GFP sotto il controllo del promotore 35S sono state utilizzate come controlli dell'esperimento. Le osservazioni al confocale sono state effettuate presso i laboratori della dott.ssa Ida Ruberti dell'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR- IBPM (Roma).

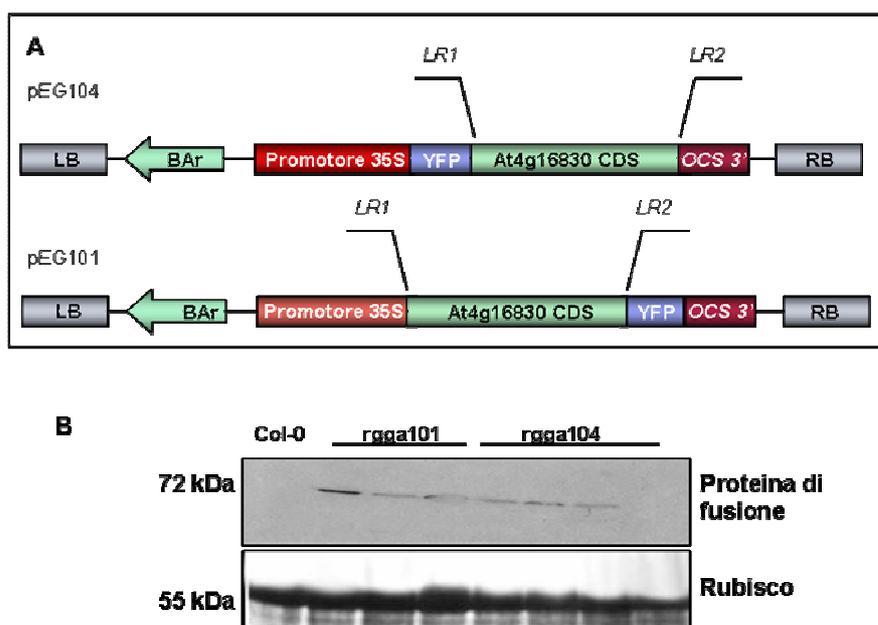


Figura 20. Analisi molecolari di piante transgeniche sovraesprimenti la proteina di fusione YFP-RGGA. (A) La sequenza codificante del gene *rgga* è stata clonata mediante tecnologia *gateway* in frame al N- e al C- terminale del gene reporter YFP rispettivamente nei vettori pEG104 e pEG101. (B) Analisi *western blotting* con anticorpo contro il peptide FLAG ha confermato la traduzione della proteina di fusione FLAG-RGGA al N- ed al C-terminale

I *seedlings*, prima dell'osservazione al microscopio, sono stati immersi in una soluzione di propidio ioduro al fine di evidenziare i nuclei e la pareti cellulari. Sono state osservate al microscopio diverse zone anatomiche delle piantine, in particolare quelle di proliferazione, di allungamento e di differenziamento della radice, la regione dell'ipocotile ed i cotiledoni. Nessuna differenza di localizzazione è stata osservata tra piante esprimenti la YFP fusa all'estremità carbossiterminale e piante esprimenti la fusione all'estremità amminotermiale.

Nella regione più distale della radice, ad elevata attività meristemica, la proteina di fusione localizza a livello del cappuccio laterale, delle cellule della columella. e delle cellule dell'epidermide. In questa regione si evidenzia una fluorescenza diffusa che coincide con una localizzazione prevalentemente citoplasmatica della proteina (Fig.21C)

Dall'osservazione di cellule più differenziate contenute nella regione di allungamento (Fig. 21D), è possibile confermare che la proteina localizza nel citoplasma e più in particolare assume una distribuzione perinucleare. Sulla superficie cotiledonare, inoltre, è stato osservato un forte accumulo della proteina chimerica negli stomi (Fig. 21E).

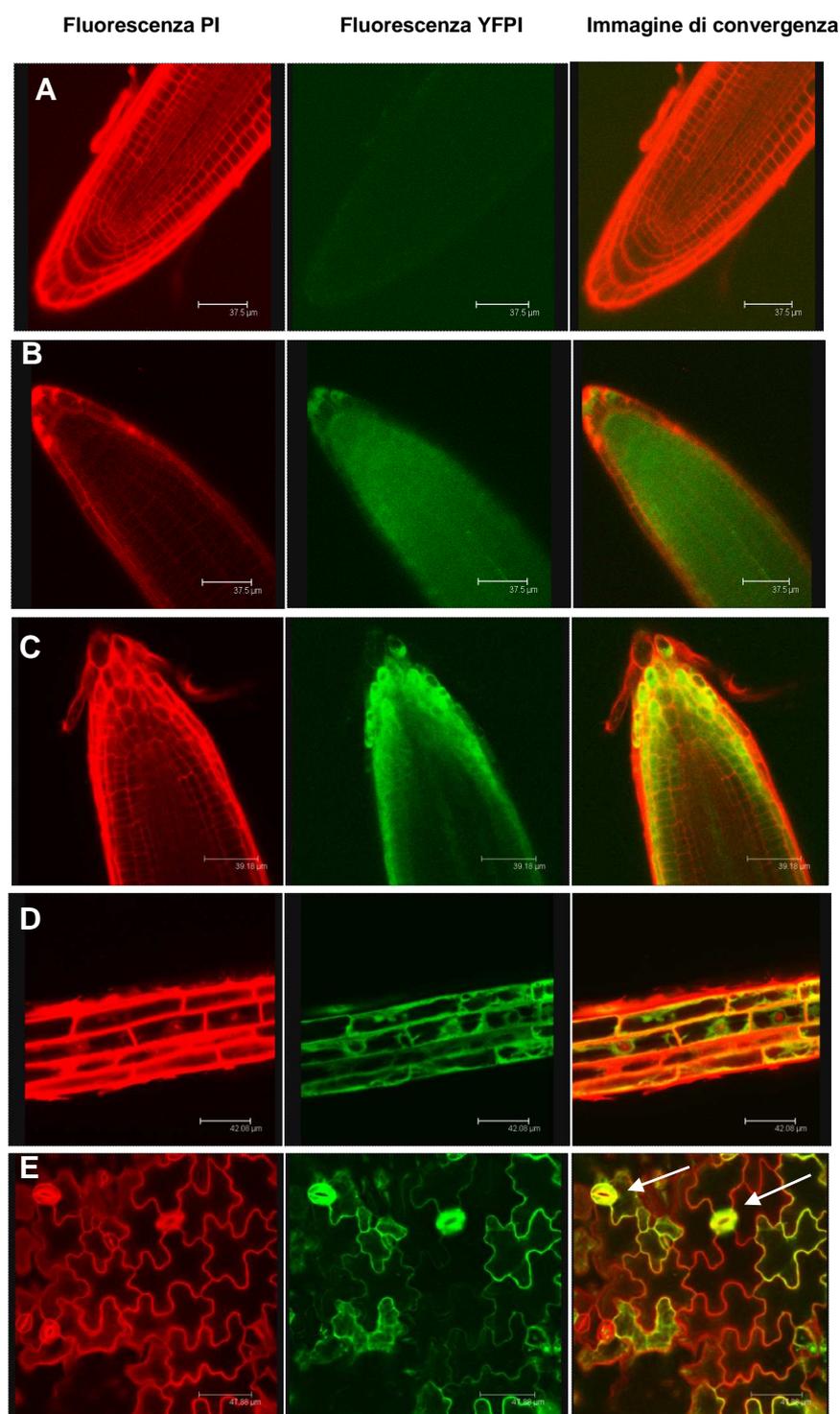


Figura 21. Localizzazione della proteina di fusione YFP-RGGA in *Arabidopsis* mediante microscopia confocale. Da sinistra verso destra sono riportate rispettivamente la fluorescenza del propidio ioduro, la fluorescenza della YFP, l'immagine di convergenza delle singole fluorescenze. (A) *Seedling* trasformati con vettore vuoto. (B) Piante controllo sovraesprimenti la proteina GFP. (C) Apice radicale di *seedling* overesprimenti la proteina di fusione YFP-RGGA. (D) Localizzazione subcellulare di YFP-RGGA in cellule epidermiche della radice primaria. (E) Localizzazione di YFP-RGGA in cellule epidermiche del cotiledone, le frecce bianche indicano le cellule stomatiche.

Dal profilo di sezioni superficiali e sezioni interne della radice è apparso un caratteristico *pattern* di localizzazione (Fig. 22). La proteina, infatti, sembra accumularsi in maniera uniforme lungo l'epidermide della radice. Al contrario, appare assente negli strati più interni (regione corticale, endoderma e fascio vascolare) della regione apicale, accumulandosi gradualmente in questi strati osservando la zona di accrescimento.

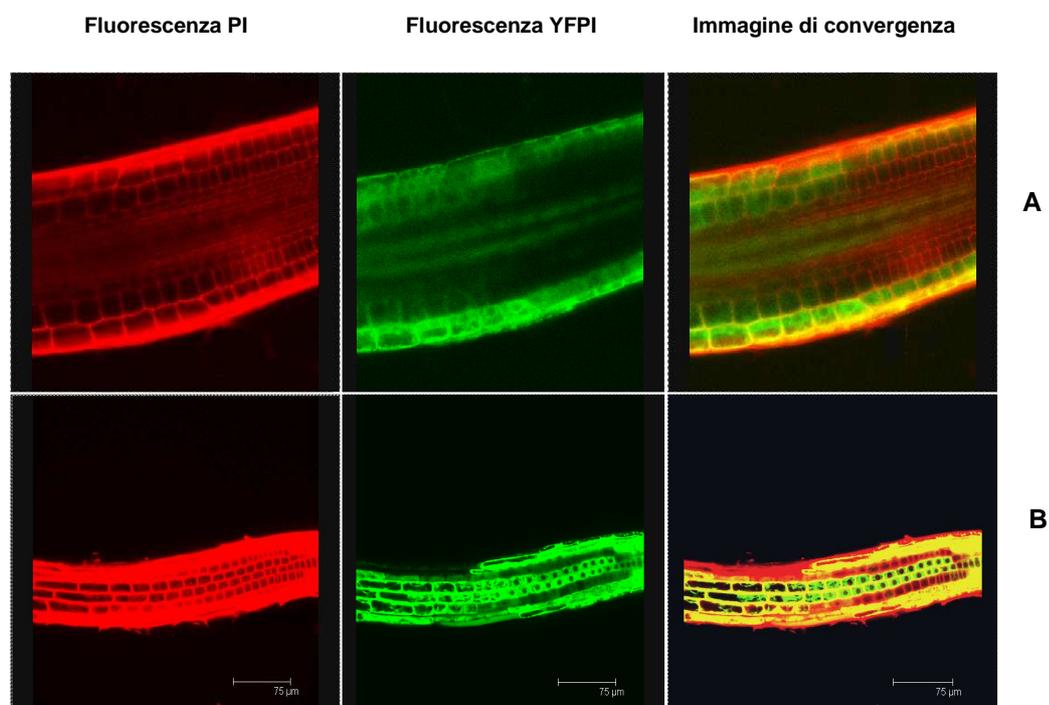


Figura 22. Profilo di localizzazione della proteina di fusione UVR8::YFP nella regione di accrescimento radicolare di *seedling* di *Arabidopsis*. Piante di 5 giorni sono stati analizzati al microscopio confocale. Da sinistra verso destra sono riportate rispettivamente la fluorescenza del propidio ioduro, la fluorescenza della YFP, l'immagine di convergenza delle singole fluorescenze. (A) Sezione longitudinale interna della radice primaria. (B) Sezione superficiale epidermica della radice primaria.

3.3.5 Produzione di piante transgeniche sovraespressanti *rgga* e caratterizzazione molecolare di mutanti knockout

La possibilità di modificare geneticamente l'espressione di un gene mediante metodiche di biologia molecolare rappresenta un punto di forza nello studio del ruolo biologico e dei meccanismi molecolari mediante i quali il gene espleta le sue funzioni. Al fine di ottenere informazioni sulla funzione di *rgga* sono state generate piante di *A. thaliana* sovraespressanti il gene di interesse.

La sequenza codificante *rgga*, precedentemente clonata nel vettore pDONR207 (Cfr. 2.5.2), è stata trasferita mediante la reazione gateway LR, nel vettore binario pEG202 (Fig.23A). In particolare la sequenza di *rgga* è stata clonata in *frame* all'estremità C- terminale dell'antigene FLAG sotto il controllo del promotore 35S. Il plasmide ricombinante, ottenuto contenente il costrutto 35S::FLAG-RGGA, è stato, quindi, utilizzato per la trasformazione genetica stabile in *A. thaliana* mediata da *A. tumefaciens*.

I semi T1 ottenuti (*rgga202*) dalla trasformazione sono stati allevati su terreno contenente glufosinate ammonio (BASTA®); le piantine selezionate sono state analizzate via PCR utilizzando *primer* specifici per la cassetta di espressione (Fig. 23B). L'analisi *Western Blotting* con anticorpo contro l'antigene FLAG ha mostrato l'espressione della proteina di fusione in diverse linee transgeniche (Fig. 23C).

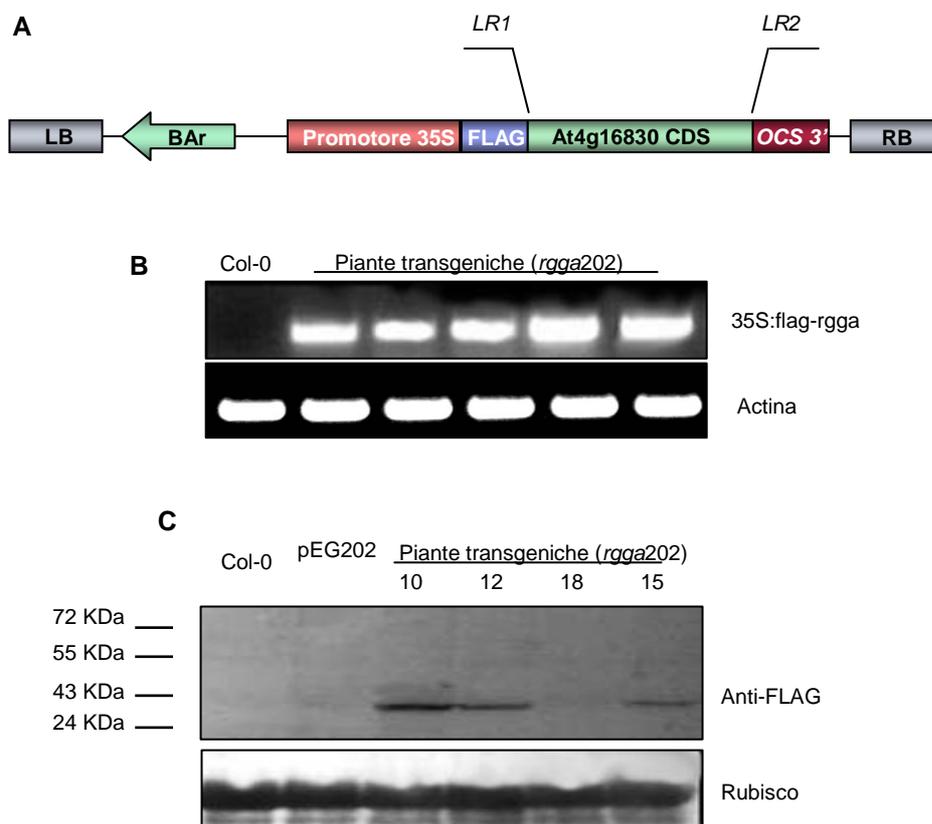


Figura 23. Trasformazione genetica di piante di *A. thaliana* sovraesprimenti la proteina di fusione FLAG-RGGA. (A) costrutto utilizzato nella trasformazione dei bocci fiorali mediante *floral dipping*. (B) Verifica dei trasformanti mediante PCR utilizzando *primer* specifici per la cassetta di espressione. (C) Analisi *Western* di piante transgeniche con anticorpo Anti-FLAG.

Parallelamente è stato ottenuto dal catalogo del NASC (<http://arabidopsis.info>) un mutante *knockout* per gene *rgga*. (*SALK_14.35.14*, *rgga ko*). L'inserzione del T-DNA localizzata nel primo introne del gene è stata verificata mediante amplificazione PCR da DNA genomico (Fig. 20B-C), utilizzando una combinazione di oligonucleotidi suggeriti dal *database* SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>) e riportati in maniera esemplificativa nella Fig. 24A.

La combinazione di *primer* specifici del gene *rgga* (LP e RP) ha prodotto una amplificazione della dimensione attesa solo nel genotipo controllo Col-0 (Fig 24B). Al contrario la combinazione di un *primer* costruito sul *left border* del T-DNA (Lba1) e di un *primer* gene-specifico ha amplificato un frammento di DNA solo nel mutante. L'analisi PCR, quindi, conferma che la linea *salk_14.35.14* (*rgga ko*) contiene l'inserzione nel gene *rgga* e che tale inserzione si trova su entrambi gli alleli (omozigote inserzionale). Una analisi RT-PCR su RNA estratto dal genotipo controllo

e dal mutante *rgga ko* ha evidenziato l'assenza di trascritto nel mutante inserzionale (Fig. 24C).

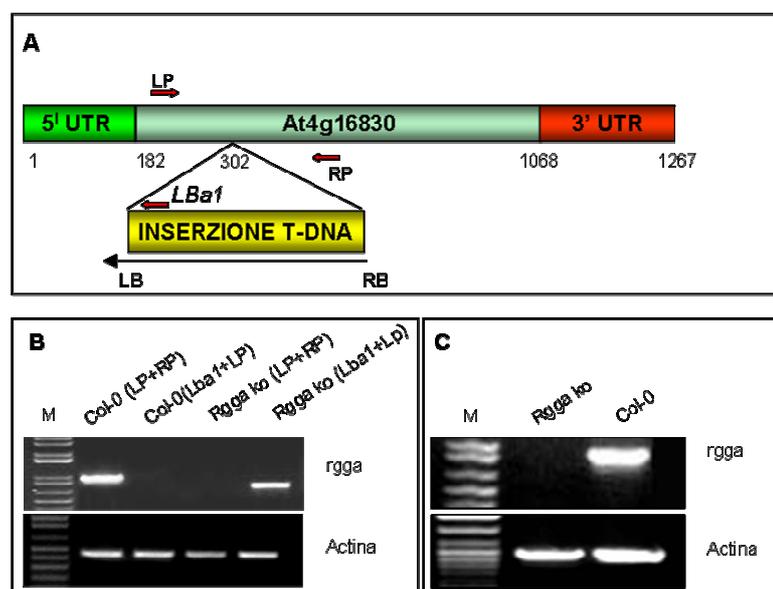


Figura 24. Analisi molecolare del mutante *Knockout (rgga ko)* SALK_143514 di *A. thaliana*. (A) Rappresentazione schematica dell'inserzione T-DNA nel locus At4g16830. (B) L'analisi PCR su DNA genomico conferma l'inserzione del T-DNA. (C) L'analisi RT-PCR su RNA totale utilizzando primer specifici del gene *rgga* dimostra l'assenza del trascritto.

3.3.6 Caratterizzazione fenotipica del mutante knockout e delle piante transgeniche in risposta a stress

Al fine di valutare la risposta allo stress e la capacità di adattamento in condizioni di crescita non ottimali, il mutante inserzionale *rgga ko* e le piante sovraesprimenti la proteina di fusione FLAG-RGGA sono stati utilizzati in differenti saggi fisiologici.

ANALISI DELLA TOLLERANZA A STRESS. Giovani piante di 2 settimane allevate su terreno di coltura GM sono state trasferite su substrato contenente differenti concentrazioni di NaCl e PEG. Il mutante *rgga ko* dopo 7 giorni ha mostrato un evidente sbiancamento delle foglie (*bleaching*) ed una ridotta percentuale di sopravvivenza, fino a circa 20% in presenza di 200 mM di NaCl. Al contrario, le linee *rgga202* hanno presentato una taglia più piccola e foglie più verdi rispetto al controllo, mostrando in presenza di stress una elevata percentuale di sopravvivenza (circa 80%) (Fig. 25).

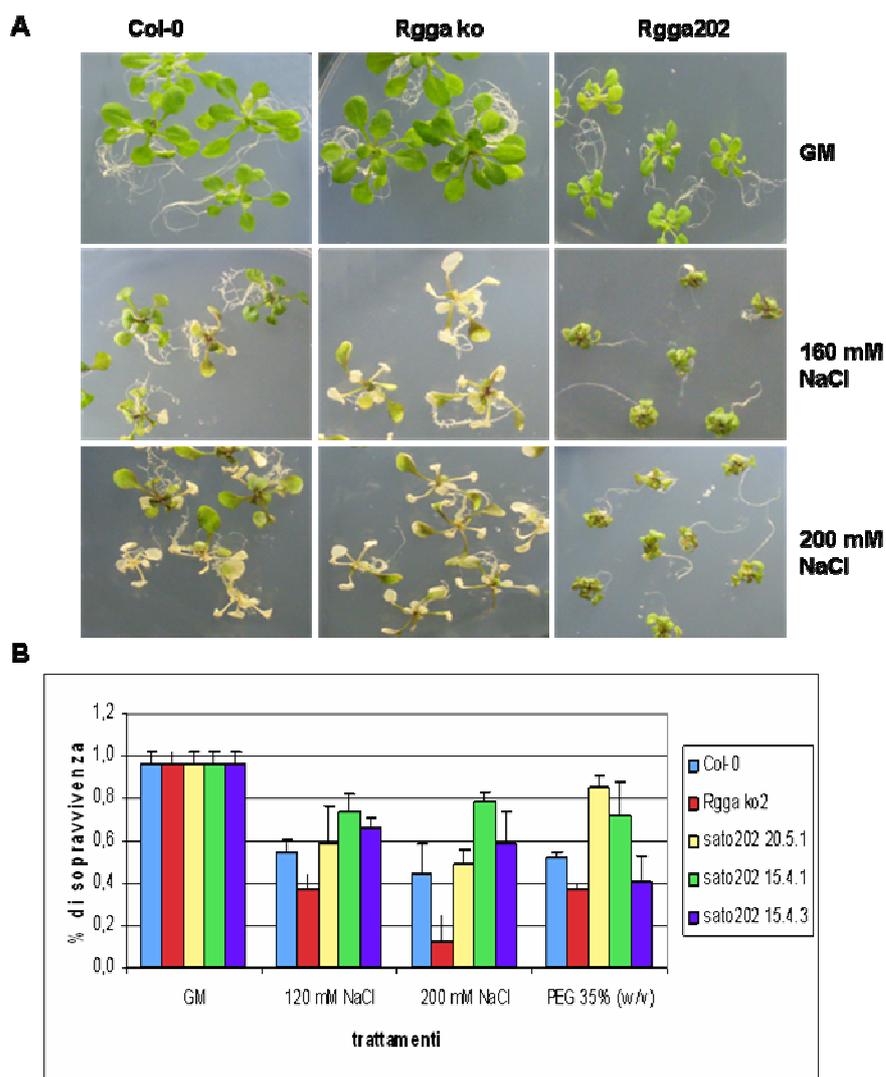


Figura 25. Test di tolleranze su piante di *A. thaliana*. (A) *seedling* di 18 giorni germinati su GM sono stati trasferiti su terreno di coltura addizionato con 160 e 200 mM NaCl. Da sinistra verso destra si osservano rispettivamente i fenotipi dei genotipi Col-0, mutante K.O e di una linea sovraesprimente. (B) Valutazione dei livelli di tolleranza nel terreno controllo ed in presenza di 160 mM NaCl dopo 7 giorni di trattamento.

ANALISI DI GERMINAZIONE. Semi di piante T₂ *rgga202*, selezionate per una singola inserzione del T-DNA, ed il mutante inserzionale *rgga ko* sono stati germinati in presenza di diverse concentrazioni di NaCl. Piante trasformate con il solo vettore (empty vector) sono state utilizzate come controllo. L'analisi, effettuata in triplicato, ha evidenziato che la percentuale di germinazione dei semi *rgga ko* è ridotta del 20% in presenza di 120 mM di NaCl rispetto alle piante controllo e alle piante trasformate con il vettore vuoto. La stessa analisi, inoltre, ha rivelato che in presenza di sale le piante transgeniche sovraesprimenti la proteina *RGGA* presentano una maggiore capacità di germinazione rispetto ai genotipi di controllo (Fig. 26).

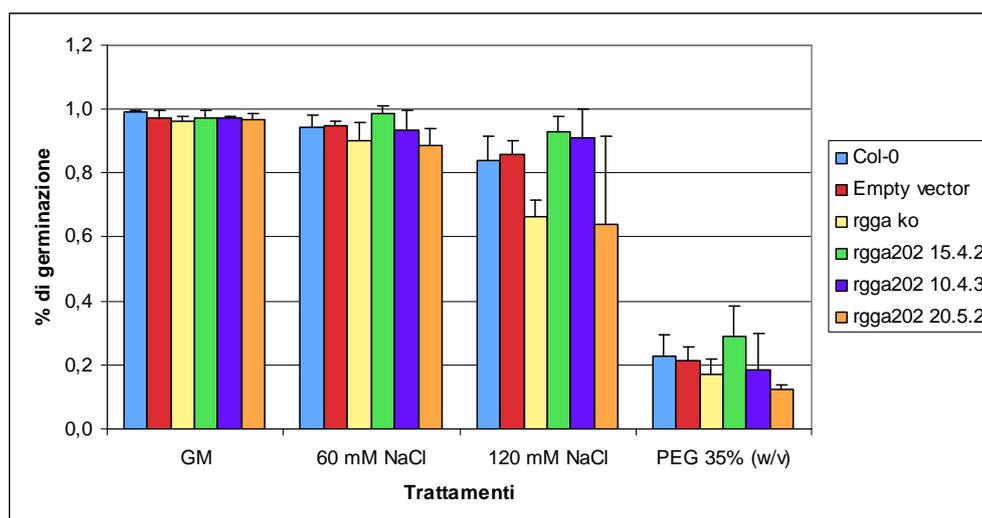


Figura 26. Analisi di germinazione di mutanti *knockout* e piante transgeniche sovraesprimenti il gene *rgga*. La germinazione è stata valutata in termine di espansione del cotiledone verde. I dati sono stati raccolti dopo 7 gg di trattamento.

ACCUMULO DI PROLINA. Piante di *Arabidopsis* allevate *in vivo* per quattro settimane sono state sottoposte a stress osmotici di diversa natura; in particolare, le piante sono state private completamente di acqua per sette giorni o sono state innaffiate con una soluzione contenente 300 mM NaCl; l'accumulo di prolina è stato determinato dopo 7 giorni di trattamento (Fig. 27). In condizioni controllo non sono state osservate differenze significative delle quantità di prolina accumulata nelle diverse linee studiate. Dopo sette giorni di deficit idrico, il genotipo controllo e la linea *rgga ko* hanno mostrato un incremento di prolina pari a dieci volte quello misurato in condizioni controllo. Le linee *rgga202*, invece, hanno mostrato incrementi dei livelli di circa sette volte rispetto alle condizioni controllo; le analisi statistiche hanno mostrato che le linee *rgga202* presentano una riduzione significativa del 25% dell'accumulo di prolina rispetto al genotipo controllo.

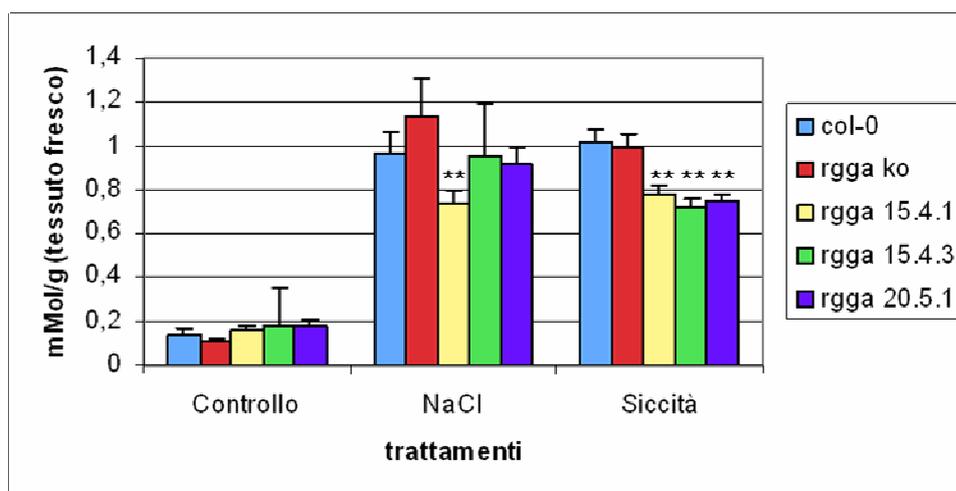


Figura 27. Livelli di prolina libera in piante di *A. thaliana*. Piante di 4 settimane allevate *in vivo* sono state sottoposte per sette giorni a stress osmotico di diversa natura. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto alle piante controllo determinate mediante test *t* di student ($P < 0,01$).

4 DISCUSSIONE

Gli stress osmotici inducono profonde alterazioni dei processi biochimici e fisiologici delle piante (Araus et al., 2002) con evidenti conseguenze sulla produttività agricola. I meccanismi di risposta attivati dipendono strettamente dalla durata e dall'intensità dello stress e dalla capacità, mediante attivazione di geni e funzioni geniche specifiche, di elicitare risposte cellulari a breve e lungo termine, tali da limitare i danni e preservare le strutture cellulari (condizioni di *shock*) e di ripristinare un nuovo equilibrio omeostatico (risposta adattativa) (Leone et al., 1999).

La comprensione di come i fattori ambientali controllano specifici set di geni è di fondamentale importanza per un'agricoltura moderna, non meramente basata sull'ottimizzazione delle condizioni colturali (a volte impossibili o economicamente svantaggiose), ma piuttosto sulla possibilità di modulare l'espressione genica in modo da instaurare un adattamento dell'organismo vegetale in grado di garantire stabilità produttiva anche in condizioni sfavorevoli.

Nella presente tesi, colture cellulari in sospensione di patata sottoposte a condizioni di stress idrico di diversa durata (condizioni *shock* o di adattamento), sono state utilizzate come sistema sperimentale per chiarire le basi molecolari della risposta a stress idrico identificando geni e funzioni geniche essenziali in tali processi.

Le colture cellulari rappresentano un valido strumento per delucidare la complessità dei meccanismi di trasduzione dei segnali esogeni permettendo di focalizzare l'attenzione sulla biochimica e fisiologia cellulare alla base del mantenimento dell'omeostasi in condizioni di stress (Grillo *et al.*, 1996; Takahashi et al., 2004). Benché il sistema sperimentale utilizzato rappresenti una esemplificazione dei complessi meccanismi fisiologici della risposta allo stress osmotico, la validità dell'uso delle colture cellulari è fortemente supportata dall'evidenza che piante rigenerate da cellule tolleranti esibiscono *in vivo* tale tolleranza (Bressan *et al.*, 1987).

Uno studio fisiologico, precedentemente effettuato, ha dimostrato che cellule di patata adattate allo stress idrico, contrariamente alle cellule sottoposte a *shock*, erano in grado di crescere in terreni di coltura addizionati con alte concentrazioni di PEG ed NaCl. I livelli cellulari di acido abscissico (ABA), uno dei principali mediatori del segnale di carenza idrica, erano drasticamente accresciuti in cellule sottoposte a *shock*, mentre restavano inalterati in popolazioni cellulari adattate a bassi potenziali osmotici. Infine, uno studio *in vivo* ha dimostrato che l'adattamento allo stress idrico ripristinava la sintesi proteica, drasticamente inibita in condizioni di *shock* (Leone et al., 1994; Leone et al., 1994).

Al fine di identificare a livello molecolare i geni coinvolti nei due diversi aspetti del complesso meccanismo di risposta a stress idrico, ed in particolare, nell'adattamento graduale, è stato effettuato uno studio del trascrittoma di patata mediante la tecnologia dei *microarray*. Tale tecnica si è confermata come quella più versatile per un'analisi su vasta scala di genomi di molte specie vegetali, tra cui patata (www.tigr.org) e ha permesso negli ultimi anni l'identificazione e caratterizzazione di un ampio set di geni coinvolti nei meccanismi di risposta a stress abiotici (Bohnert et al., 2006), in particolare allo deficit idrico (Kreps et al.,

2002; Hazen et al., 2003) evidenziando e confermando la complessità del fenomeno.

4.1 Network di geni coinvolti nella risposta allo stress idrico di breve e lunga durata

L'analisi *microarray* su RNA da popolazioni cellulari di patata sottoposte a condizioni di stress idrico di diversa durata ha evidenziato un totale di 1055 geni con profilo di espressione alterato rispetto alle condizioni di controllo. In particolare 129 geni sono risultati indotti nelle cellule stressate (condizioni *shock*), 337 geni indotti nelle cellule adattate, 174 geni sotto-regolati in risposta a condizioni di *shock* osmotico e 415 geni sotto-regolati nell'adattamento.

Dai dati sopra citati appare evidente che la risposta molecolare, in termini di geni differenzialmente regolati, risulta più complessa nelle popolazioni cellulari adattate allo stress; circa 760 geni, infatti, mostrano un profilo di espressione alterato durante l'adattamento alla carenza idrica, a dispetto dei circa 300 geni indotti o repressi in risposta a condizioni di *shock* idrico.

L'analisi dei dati ha indicato, inoltre, che solo 16 geni sono comunemente regolati nelle cellule adattate ed in quelle stressate. La presenza di un ridotto numero di geni, similmente modulati nelle due popolazioni cellulari, conferma che condizioni di *shock* e di adattamento a stress inducono a livello molecolare una risposta molto diversificata, strettamente dipendente dall'intensità e dalla durata dello stress imposto e risultante nell'attivazione di geni con ruoli e funzioni diverse. I geni sovraespressi nel breve periodo possono codificare, infatti, per funzioni geniche importanti per una risposta veloce, indotta dai danni cellulari occorsi e finalizzata a fornire un'iniziale protezione e amplificazione dei segnali di stress; i geni attivati nella risposta di lungo termine potrebbero, invece, avere un ruolo diretto nell'adattamento e tolleranza a stress (Bray, 2004). Dal punto di vista metodologico, i dati prodotti con la tecnologia dei *microarray* necessitano di una ulteriore validazione mediante altre tecniche di analisi di espressione. Infatti, le piante hanno un alto numero di famiglie multigeniche e il rischio di ibridazioni non specifiche può condurre a false interpretazioni, così come analisi statistiche poco precise possono contribuire alla propagazione di errori tecnici (Gachon et al., 2004). La tecnologia *Real Time* PCR (qRT-PCR) è stata impiegata, quindi, nella convalida degli esperimenti *microarray* effettuati. Tale analisi condotta su 25 trascritti, tra cui geni codificanti per una saccarosio sintasi, una catalasi, una proteina *RNA-binding* e due proteine chinasi, ha confermato il profilo di espressione di tutti i geni analizzati. La verifica, effettuata mediante qRT-PCR su un ampio numero di geni, oltre a confermare i dati ottenuti, ha dimostrato, inoltre, che alcuni dei trascritti identificati sono comunemente regolati nelle cellule adattate ed in quelle stressate. E' possibile ipotizzare che un discreto gruppo di geni comuni alle due condizioni sperimentali, sia stato eliminato dal risultato finale dell'analisi *microarray* a causa della complessa elaborazione statistica applicata all'analisi dei dati di espressione.

Le EST differenzialmente regolate nell'analisi del trascrittoma sono state classificate secondo il catalogo funzionale *Funcat*, che comprende 28 categorie per identificare e catalogare, laddove possibile, funzioni geniche secondo le principali attività

cellulari. Tale sistema di catalogazione permette una classificazione gerarchica, indipendente dalla tipologia di organismo considerato e, soprattutto, flessibile (Ruepp et al., 2004). I criteri adottati dal *FunCat* si adattano bene alla caratterizzazione di genomi poco conosciuti, come quello di patata. In particolare, nel presente lavoro, le categorie funzionali maggiormente rappresentative sono quelle dei fattori trascrizionali, del metabolismo degli zuccheri, della biosintesi ormonale, della sintesi proteica e delle proteine da stress.

L'analisi *microarray*, inoltre, ha evidenziato che gran parte dei geni identificati, dal 31% al 47%, non presenta alcuna omologia con geni noti (geni *unknown*). Il sequenziamento incompleto del genoma di patata e la mancanza di dati funzionali rende poco agevole l'identificazione dei cloni utilizzati nell'allestimento dei vetrini *microarray* (Rensink et al., 2005). Resta, comunque, di fondamentale interesse, considerare i geni *unknown* nelle successive analisi, in quanto fonti di nuove interessanti funzioni geniche non ancora catalogate.

I dati, relativi alla classificazione ed al numero di geni identificati nel presente lavoro, sono in linea con quelli ottenuti in studi recenti del trascrittoma di patata in risposta a condizioni di stress. In patata, un primo studio è stato effettuato da Buell e collaboratori (2005) su foglie e radici di piante allevate in condizioni controllo, di basse e alte temperature ed in presenza di elevate concentrazioni di sale. I risultati indicano che le basse temperature inducono un rilevante cambiamento nel trascrittoma con circa 2.584 geni con profilo di espressione modificato, mentre 1.149 cloni e 998 cloni sono risultati indotti o repressi in risposta a stress salino e da alte temperature rispettivamente (Rensink et al., 2005).

Recentemente, risultati di interesse sono stati ottenuti dallo studio del trascrittoma di specie di patate andine (*S. tuberosum ssp andigena*) sottoposte a stress idrico. Le ricerche hanno evidenziato che le accessioni maggiormente tolleranti in condizioni di siccità presentavano una maggiore espressione costitutiva di geni coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi (Watkinson et al., 2008) e che in due sottospecie di patate andine (Sullu e SA2563) è stato riscontrato un maggiore accumulo di proteine *chaperone* come le proteine *heat shock* (HSP) e LEA (Schafleitner et al., 2007). Infine, un'ulteriore analisi di espressione in genotipi andini ha suggerito che la tolleranza alla siccità è correlata alla sovraespressione di proteine HSP plastidiali e proteine con attività antiossidanti (Vasquez-Robinet et al., 2008).

I risultati del presente studio di tesi indicano che alcuni dei geni identificati come differenzialmente espressi in colture cellulari esposte a stress di breve e lungo termine ricoprono putativamente funzioni importanti nei meccanismi di risposta a stress; di seguito sono discussi i risultati relativi ad alcuni geni identificati e classificati nelle principali categorie funzionali rilevate.

- GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE

In risposta allo stress idrico di breve durata è risultata indotta in patata l'espressione di importanti regolatori della trascrizione come GIGANTEA, COL-1 (costans like 1), una proteina della famiglia MYB e un fattore di trascrizione (FT) del tipo SCARECROWN (SLC1)'. In *Arabidopsis*, GIGANTEA è attivato in risposta a stress; in particolare, la sua sovraespressione induce tolleranza a condizioni di stress ossidativi mediante l'attivazione dell'espressione dei geni codificanti per la superossido dismutasi (SOD) e per l'enzima ascorbato perossidasi (APX) (Cao et al., 2006). In cellule adattate di patata sono risultati sovraespressi FT come TINY, WRK40 e diverse proteine con domini *zinc finger*. TINY contiene un dominio

APETALA2 e si lega ad elementi regolatori come DRE (Dehydration-Responsive Element) ed ERE (Ethylene-Responsive Element). La sovraespressione in *Arabidopsis* di questo gene induce l'attivazione di molti geni contenenti gli elementi DRE ed ERE, facendo ipotizzare, quindi, un ruolo importante nei meccanismi di *cross-talking* in risposta a stress di diversa natura (Sun et al., 2008).

L'induzione nelle cellule adattate del gene regolatore *wrky40* è di particolare interesse; recentemente infatti, in uno studio bioinformatico, l'espressione di tale gene è stata correlata alla risposta a sollecitazioni di natura sia biotica che abiotica, per cui *wrky40* potrebbe rappresentare un altro importante tassello nei meccanismi di difesa delle piante e di *cross-talk* tra *pathway* diversi (Ma and Bohnert, 2007).

L'espressione di diversi FT, noti per il loro coinvolgimento nella risposta allo stress, è risultata repressa in colture cellulari di patata adattate a bassi potenziali idrici. Tra questi, in particolare, sono stati ritrovati i geni codificanti per WRKY54, WRKY 75, un fattore MYB, TUBBY 10, STOP1.

I dati prodotti sono in accordo con i risultati di altri autori che, in analisi globali di espressione e/o approcci più convenzionali, hanno identificato, decine di fattori trascrizionali coinvolti nella risposta delle piante alla siccità come quelli appartenenti alle famiglie AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, WRKY e Cys2His2 *zinc finger* (Umezawa et al., 2006).

Complessivamente i risultati ottenuti indicano che in seguito a stress idrico è indotta una sostanziale rimodulazione dei regolatori trascrizionali. Probabilmente in condizioni di *shock*, i FT sono in grado di promuovere processi cellulari di immediata risposta al fine di proteggere funzioni geniche importanti e di trasdurre il segnale di stress. In condizioni di adattamento, invece, una mobilitazione di regolatori in grado di riprogrammare i processi metabolici e cellulari è indispensabile per promuovere il mantenimento dell'equilibrio omeostatico.

- GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELLA SINTESI PROTEICA

La sintesi proteica è uno dei processi biochimici maggiormente influenzato da stress (Patel et al., 2002) e in genere in diverse specie vegetali è riportata una forte inibizione della sintesi proteica in risposta a scarsa disponibilità di acqua (Good and Zaplachinsky, 2006).

L'espressione di geni coinvolti nella sintesi proteica è inibita in cellule sottoposte a *shock* idrico; in particolare sono risultati negativamente regolati i trascritti codificanti per diverse proteine ribosomiali 40S e 60S, per un fattore di elongazione (eIF4-gamma) e per una proteina SRP9. Nessuna alterazione significativa della sintesi proteica, invece, è stata riscontrata in colture cellulari di patata adattate a bassi potenziali osmotici. I dati confermano ed integrano i risultati delle analisi bidimensionali delle proteine estratte dalle diverse popolazioni cellulari di patata che indicavano una forte riduzione della sintesi proteica nella popolazione di cellule sottoposte a condizioni di stress idrico improvviso (*shock*) (Leone et al., 1994b).

In base ai risultati ottenuti è possibile quindi ipotizzare che nelle cellule esposte a *shock* idrico è attivo un meccanismo di regolazione a livello trascrizionale della sintesi proteica mediante inibizione dell'espressione di componenti fondamentali della *machinery* traduzionale limitando così il naturale *turnover* proteico. La riduzione delle attività legate alla sintesi di nuove proteine potrebbe rappresentare un meccanismo volto a limitare la traduzione di trascritti non essenziali in risposta a segnali di stress; l'aumento di trascritti *stress-responsive* e la riduzione dell'attività dell'apparato di traduzione, infatti, potrebbero rappresentare una delle possibili

strategie possibili per concentrare, nel compartimento cellulare, proteine utili e rispondere con maggiore incisività allo stimolo ambientale.

Non è da sottovalutare, comunque, l'intervento di sistemi coinvolti nella degradazione di proteine danneggiate irreparabilmente dagli effetti del danno osmotico (Grillo *et al.*, 2006). Nessuna rilevanza di tali meccanismi è stata ritrovata a livello trascrizionale nelle colture cellulari studiate.

Durante l'adattamento, contrariamente a quanto avviene in risposta a condizioni di *shock*, si riscontra un ripristino della sintesi proteica, paragonabile alle condizioni di controllo, a conferma del recupero delle normali funzioni cellulari in tale popolazione cellulare (Leone *et al.*, 1994 a e b).

- GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL BILANCIO ORMONALE

In popolazioni cellulari di patata adattate a bassi potenziali osmotici è stata riscontrata la sovraespressione di importanti componenti del *pathway* dell'etilene (ACS, EIN4, SAM2).

L'etilene è un ormone vegetale che riveste fondamentali funzioni in molti aspetti del ciclo vitale della pianta; la sua biosintesi è finemente regolata da segnali endogeni durante lo sviluppo ed in risposta a stimoli ambientali di tipo biotico ed abiotico (Ecker, 1995). Il composto S-adenosylmetionina (S-AdoMet), oltre ad essere un importante donatore di gruppi metilici in diversi processi cellulari, rappresenta anche il principale precursore della biosintesi dell'etilene. La prima reazione del *pathway* biosintetico è la conversione dell'S-AdoMet in acido-1-amminociclopropano-1-carbossilico (ACC) catalizzato dall'enzima ACC sintasi (ACS); la formazione di etilene avviene mediante ossidazione dell'ACC da parte di una ACC ossidasi (ACO). I livelli di etilene sono controllati da meccanismi di *feedback* negativi che agiscono sulle principali reazioni biosintetiche (Wang *et al.*, 2002).

Cellule di patata acclimatate allo stress idrico hanno presentato livelli di etilene sei volte superiori alle cellule controllo; mentre nessuna variazione significativa del livello di etilene è indotta in cellule sottoposte a condizioni di *shock* (Scaramaglia *et al.*, 2000). I risultati delle analisi *microarray* hanno permesso di identificare alcune componenti molecolari che regolano il *pathway* di biosintesi e di segnalazione dell'ormone nelle cellule adattate (Fig. 28). In particolare, nel sistema di adattamento studiato, l'induzione dell'enzima S-adenosil-metionina sintetasi (SAM2) suggerisce un maggiore accumulo del precursore ormonale S-AdoMet durante l'adattamento; la sovraespressione dell'enzima ACS, inoltre, potrebbe essere alla base dell'incremento di produzione di etilene nelle colture cellulari adattate. In aggiunta, la repressione dell'enzima ACO potrebbe rappresentare l'effetto di una regolazione a *feedback* negativo in presenza di alte concentrazioni dell'ormone. L'espressione di un importante recettore dell'etilene EIN4 (Ethylene Insensitive) è inoltre indotta a conferma dell'attivazione del *pathway* di risposta mediato da etilene. In ultimo, la rappresentativa sovraespressione in cellule adattate di geni di difesa dall'attacco di patogeni, tipicamente attivati in risposta all'etilene, conferma il ruolo dell'ormone nella risposta di tipo adattativo allo stress idrico e pone l'etilene in un importante nodo di *cross-talk* nella risposta a stress biotici ed abiotici.

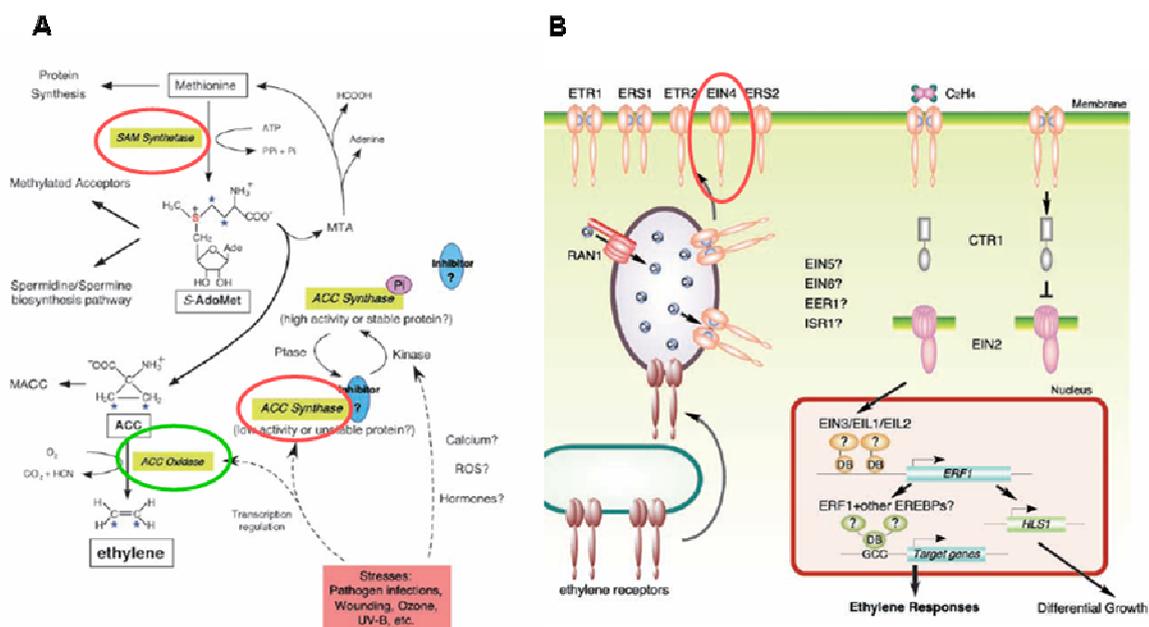


Figura 28. Rappresentazione schematica della biosintesi (A) e del *pathway* di segnalazione dell'etilene (B). Sono evidenziati i geni sovraespressi (ovale rosso) e quelli repressi (ovale verde) nelle colture cellulari adattate allo stress idrico (modificata da Wang et al., 2002).

4.2 Identificazione di geni stress-responsive in piante di *S. tuberosum*

La risposta cellulare, per quanto vicina alla fisiologia dell'intero organismo, può rappresentarne solo un modello esemplificativo da cui trarre informazioni utili da trasferire sul sistema di interesse. Un *set* di geni, sovraespressi in colture cellulari di *S. tuberosum* in condizioni di *shock* e di adattamento a bassi potenziali osmotici, è stato, quindi, successivamente studiato in piante di patata, al fine di definire il coinvolgimento di tali geni nella risposta allo stress nella pianta adulta ed in situazioni più simili alle reali condizioni di campo.

L'analisi di espressione, in foglie e radici di piante allevate in condizioni di carenza idrica, è stata condotta mediante qRT-PCR. Lo studio ha dimostrato che più della metà dei trascritti analizzati in cellule era sovraespresso in foglie prelevate da piante esposte a condizioni di deficit idrico; alcuni trascritti, inoltre, hanno presentato un livello di induzione molto più elevato nel tessuto vegetale che in cellule, suggerendo un concreto intervento degli stessi nei meccanismi di risposta della pianta. Tra i geni maggiormente sovraespressi nelle foglie sono stati identificati trascritti codificanti per una proteina chinasi, una saccarosio sintasi (*sus4*), un canale ionico, una catalasi (*cat2*), una proteina *heat shock* (*hsp 81-2*) ed una proteina *RNA-binding* (*rgga*).

La saccarosio sintasi (*sus*) è un enzima chiave nel metabolismo degli zuccheri; esso catalizza la conversione reversibile del saccarosio in UDP-glucosio e fruttosio. L'isoforma *sus4* di *S. tuberosum* è riportata essere costitutivamente espressa ad alti livelli nei tuberi, nei germogli e nei meristemi (Fu et al., 1995). In *Arabidopsis*, inoltre, l'espressione di *sus4* è indotta in condizioni di anossia, mentre sembra non essere regolato da stress idrici (Baud et al., 2004). Il gene *hsp 81-2* appartiene alla famiglia delle chaperonine, importanti componenti del mantenimento dell'omeostasi cellulare in condizione di crescita ottimali o avverse. Esse sono responsabili di numerose

attività come il *fold*ing, assemblaggio e traslocazione di proteine, la stabilizzazione di membrane cellulari e possono assistere al *refold*ing durante condizioni di stress. Le proteine *heat shock* sono significativamente espresse non solo in risposta a stress termici ma anche in condizioni di stress idrico, salino, osmotico e ossidativo (Wang *et al.*, 2004). La catalasi 2 (*cat2*) gioca un ruolo chiave nella detossificazione cellulare dalle specie reattive dell'ossigeno; essa, in particolare, catalizza la conversione del perossido di idrogeno in acqua ed ossigeno (Scandalios, 1990). La sovraespressione di *cat2* in cellule e in piante di patata rappresenta un chiaro tentativo di ridurre il l'eccesso di radicali ROS (Reactive Oxygen Species) generato dal deficit idrico.

In radici di piante allevate in condizioni di scarsa disponibilità di acqua, solo tre del *set* di geni analizzati (chinasi, canale ionico e *rgga*) risultano indotti; è possibile ipotizzare che i tre geni svolgano un ruolo importante nei meccanismi di protezione a condizioni di stress, intervenendo in maniera ubiquitaria nella risposta alla siccità.

Si può, quindi, considerare l'utilizzo delle colture cellulari in sospensione come uno strumento utile per l'identificazione di un significativo *set* di geni coinvolti nella risposta fisiologica a livello di pianta. E' interessante, a questo punto, approfondire lo studio funzionale dei geni identificati, al fine di contribuire all'assegnazione di funzioni geniche ancora poco conosciute in patata e, soprattutto, al fine di chiarire alcuni meccanismi biologici che consentono l'instaurarsi di processi di adattamento/tolleranza in specie vegetali.

4.3 Il gene *Rgga* (proteina *RNA-binding*) e il suo ruolo nei meccanismi di risposta a stress osmotici

– RGGG CODIFICA PER UNA PROTEINA RNA-BINDING INDOTTA DA STRESS OSMOTICI IN *SOLANUM TUBEROSUM* E *ARABIDOPSIS THALIANA*

Lo studio di espressione genica, condotto su tessuti di piante di patata esposte a siccità, ha consentito di identificare un *set* di trascritti di interesse, il cui ruolo funzionale, nella maggior parte dei casi, non è definito. Tra questi, la EST codificante per una proteina *RNA-binding* (RGGG), è risultata di particolare interesse per alcune peculiari caratteristiche. Infatti, *rgga* è sovraespresso specificamente nell'adattamento al deficit idrico; l'analisi qRT-PCR, infatti, ha mostrato che l'espressione del gene è indotta (circa cinque volte) in cellule adattate, mentre la sua espressione nello *shock* è paragonabile al controllo. Il Tentative Consensus di *rgga* (TC170986), inoltre, è costituito dall'assemblaggio di diverse EST appartenenti a librerie cDNA allestite in seguito a differenti tipologie di stress biotici ed abiotici. Inoltre, il TC del gene *rgga* di patata presenta una significativa omologia con il gene *sato2* (*salt tolerance 2*) di *Beta vulgaris*. Quest'ultimo appartiene ad un *set* di geni identificati in uno studio di complementazione di una libreria cDNA di *B. vulgaris* in popolazioni di lievito mutanti allevate su substrati salini; in particolare le cellule di lievito sovraesprimenti tale gene erano in grado di crescere in presenza di elevate concentrazioni di NaCl (Ros, non pubblicato).

L'insieme di conoscenze già disponibili e di quelle ottenute nel presente lavoro rafforzano l'ipotesi di un rilevante coinvolgimento di *rgga* in risposta a segnali esogeni diversi e, in particolare, a stress osmotici. In base a queste informazioni e considerazioni il gene è stato oggetto di una dettagliata caratterizzazione molecolare e funzionale.

L'analisi della sequenza proteica dedotta del gene *rgga* di patata, isolato nell'ambito del presente lavoro di tesi, indica che *rgga* codifica per una proteina di 356

amminoacidi caratterizzata dalla presenza di un dominio conservato di *RNA binding* e di due regioni ricche in glicina (*glycin-rich*) contenenti motivi ripetuti RGG (Arginina-Glicina-Glicina).

Le proteine ricche in glicina con attività *RNA-binding* (GRP) solo recentemente hanno trovato attenzione in biologia vegetale. Negli eucarioti, esse partecipano alla sintesi, alla maturazione, alle modificazioni ed al trasporto delle molecole di RNA. Diverse proteine *RNA-binding* sono coinvolte nella risposta vegetale a segnali ormonali e a segnali di stress (Fedoroff, 2002). I domini RGG sono stati ritrovati in diverse proteine, ma il loro ruolo non è ben chiaro; si ipotizzano diverse funzioni tra cui quelle di legame all'*RNA*, interazione proteina-proteina e il trasporto specifico nel nucleolo (Gendra et al., 2004).

Il dominio di legame contenuto in *RGGA* presenta un livello di similarità elevato con il dominio PAI-RBP 1 (*Plasminogen Activation Inhibitor- RNA binding Protein 1*) appartenente ad una superfamiglia proteica. Membri di questa famiglia sono stati ritrovati in diversi organismi metazoi includendo insetti e mammiferi (Heaton et al., 2003). In particolare PAI-RBP 1 è caratteristico della proteina SERBP1 (*SERPINE1 mRNA binding protein*) che riveste un ruolo importante nella regolazione del mRNA di un inibitore dell'attivazione del plasminogeno (PAI-1). I processi che determinano l'attivazione del plasminogeno (PA) assolvono un ruolo determinante nell'invasione di cellule tumorali e nelle metastasi; essi sono mediati da una serie di proteasi che catalizzano la conversione del plasminogeno in plasmina (Cubellis et al., 1990). Il principale regolatore di questo sistema è PAI-1 la cui sovraespressione nella tumorigenesi è ampiamente riportata. Recentemente si è dimostrato che l'espressione di PAI-1 è regolata a livello post-trascrizionale dalla proteina SERBP1 che stabilizza il trascritto PAI-1 (Koensgen et al., 2007). Il ruolo di proteine contenenti il suddetto dominio in pianta non è stato a tutt'oggi approfondito.

La proteina ***RGGA*** presenta omologie significative con sequenze di diverse specie vegetali quali *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba*, *Beta vulgaris*. Al fine di approfondire la caratterizzazione del gene *rgga* e il suo ruolo nella risposta allo stress nel presente lavoro è stato effettuato uno studio funzionale in *Arabidopsis*, specie modello nei sistemi vegetali.

Il gene *rgga* di *S. tuberosum* presenta una significativa similitudine con il locus At4g16830 di *A. thaliana*. L'analisi del profilo trascrizionale in colture cellulari di *A. thaliana* (mm2d) ha rivelato una chiara sovraespressione di *rgga* in presenza di eccesso di sale, PEG ed acido abscissico; i dati dimostrano quindi che *rgga* è un gene *stress-responsive* in specie differenti, suggerendo un ruolo importante estremamente conservato. Non è stato possibile, nel il lavoro di tesi, approfondire il ruolo di *rgga* in *Arabidopsis* durante l'adattamento cellulare, per l'impossibilità di ottenere in questa specie popolazioni adattate allo stress idrico.

In piante di *Arabidopsis*, l'espressione di *rgga* non sembra essere indotta da stress di breve termine. Giovani piantine esposte per 24 ore a diverse concentrazioni di NaCl non hanno mostrato una significativa espressione differenziale del gene in seguito al trattamento mentre un forte accumulo del trascritto è stato evidenziato in piantine esposte a stress prolungati con NaCl, PEG ed ABA. I risultati ottenuti, complessivamente, suggeriscono che *rgga* potrebbe avere un ruolo chiave nei meccanismi di regolazione nella risposta a stress di lungo durata. *Rgga*, in particolare, sembra coinvolto nella risposta agli stress osmotici essendo indotto in seguito a esposizione ad alte concentrazioni di ioni e/o a bassi potenziali idrici.

Al fine di integrare i dati di espressione con l'attività del promotore è stata condotta un'analisi *in silico* della sequenza regolatrice. Nel promotore di *rgga* sono state ritrovate alcune sequenze di legame per fattori trascrizionali regolati da diversi stress, tra cui sequenze *in cis* che legano MYB4 ed un *DRE core motif*. È noto che il motivo DRE (*Dehydration Responsive Element*) gioca un ruolo importante nella regolazione di geni *stress responsive*; le proteine DREB (*DRE Binding*), infatti, sono probabilmente i fattori trascrizionali più importanti nei meccanismi di risposta a stress abiotici quali il freddo, l'eccessiva concentrazione di sali e la scarsa disponibilità di acqua (Dubouzet et al., 2003). Alla luce dei risultati ottenuti e delle conoscenze acquisite dall'analisi *in silico* del promotore di *rgga*, è possibile ipotizzare che la regolazione dell'espressione del gene sia principalmente mediata da fattori trascrizionali di tipo DREB o MYB.

- RGGGA CONFERISCE TOLLERANZA A STRESS OSMOTICI IN ARABIDOPSIS

Un approccio molto efficace per valutare la funzione dei singoli geni nei meccanismi di tolleranza è lo studio dell'effetto della loro sovraespressione o repressione in piante transgeniche (Parinov and Sundaresan, 2000). Al fine di studiare il ruolo di *rgga* in *Arabidopsis*, è stata effettuata, quindi, un'analisi funzionale utilizzando approcci di *gain and loss of function*. In particolare sono state prodotte piante transgeniche sovraesprimenti il gene *rgga* (piante *rgga202*) e sono stati utilizzati mutanti *knockout* (*rgga ko*). Piante della linea *rgga ko* hanno mostrato una scarsa capacità di germinazione in presenza di sale; nessuna differenza significativa, invece, è stata riscontrata nella percentuale di germinazione delle linee *rgga202*. I dati suggeriscono che l'espressione di *rgga* agisce positivamente nei processi germinativi in condizioni limitanti, ma la sua sovraespressione non comporta nessun vantaggio competitivo alle linee transgeniche in presenza di stress.

Saggi di tolleranza su substrati di crescita addizionati con NaCl e PEG hanno dimostrato una scarsa capacità di adattamento del mutante *rgga ko*. Le piante, infatti, mostravano un consistente sbiancamento delle foglie accompagnato, infine, dal deperimento delle piante stesse. Le linee sovraesprimenti hanno esibito invece una maggiore tolleranza allo stress imposto, presentando un taglia più piccola e foglie più verdi rispetto al genotipo controllo. È interessante evidenziare che la inibizione e/o la sovraespressione di *rgga*, in condizioni ottimali di crescita, non determina alterazioni fenotipiche rilevanti rispetto al genotipo background (Col-0). Questo fa ipotizzare che l'espressione di *rgga* assume un valore funzionale determinante in condizioni di scarsa presenza di acqua o in presenza di alte concentrazioni di sali.

Risultati analoghi sono stati ottenuti nello studio funzionale di altre proteine GRP. Recentemente, Kim e collaboratori (2007, 2008) hanno riportato che la sovraespressione di GRP2 e di GPR7 in piante transgeniche di *A. thaliana* determina un aumento della percentuale di germinazione e di crescita in risposta a basse temperature, ad elevate concentrazioni saline ed a condizioni di stress idrico; inoltre entrambe le proteine sono state in grado di complementare la sensibilità alle basse temperature in un mutante sensibile di *Escherichia coli* (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008).

Dal panorama delineato risulta quindi evidente che l'accumulo delle proteine GRP contribuisce, in generale, all'attivazione di meccanismi di tolleranza. Sembra, inoltre, chiaro che queste proteine hanno un ruolo estremamente conservato nella scala evolutiva, complementando, a livello funzionale, meccanismi di risposta comuni in eucarioti e procarioti.

La valutazione di parametri biochimici può essere utile per il monitoraggio della fisiologia della pianta in condizioni limitanti. Al fine di definire la risposta fisiologica dei genotipi sovraespressanti *rgga202* e del mutante inserzionale *rgga ko*, è stato valutato l'accumulo di prolina (Pro) in diverse condizioni di crescita.

In particolare dopo sette giorni di siccità, piante sovraespressanti il gene *rgga* hanno presentato un incremento del livello di Pro libera significativamente ridotto rispetto al genotipo controllo ed al mutante *rgga ko*; nessuna differenza nell'accumulo di Pro è stata osservata, invece, nelle diverse linee di *Arabidopsis* in condizioni di crescita ottimali. La Prolina è un osmoprotettore che assume un ruolo chiave nella regolazione del potenziale idrico cellulare. Il suo accumulo è principalmente determinato da condizioni di stress di diversa natura; in particolare il contenuto di Pro aumenta in presenza di sali, scarsa disponibilità di acqua o nutrienti, attacchi di patogeni ed in presenza di irradiazioni ultraviolette (Saradhi et al., 1995). Piante transgeniche che accumulano maggiori livelli di Pro esibiscono una maggiore osmotolleranza (Kishor et al., 1995; Hong et al., 2000; Szekely et al., 2008). I dati ottenuti nel presente lavoro indicano che la maggiore capacità di tollerare condizioni di stress osmotici, manifestata dalle linee *rgga202*, non è riconducibile a meccanismi di osmoregolazione mediati da prolina. Resta, comunque, da stabilire se le piante transgeniche sovraespressanti *rgga* sono capaci di accumulare altri osmoprotettori (zuccheri, poliammine, glicinetaina) oppure adottano meccanismi alternativi di protezione dai danni indotti dallo stress idrico.

- RGGA E' LOCALIZZATO IN TESSUTI COINVOLTI NELLA RISPOSTA AL DEFICIT IDRICO MEDIATA DA ABA

Al fine di caratterizzare l'azione di *rgga* in pianta e definirne in modo univoco la sua funzione, sono stati utilizzati diversi approcci per localizzare, a livello di tessuti e cellule, dove il gene è espresso e dove la proteina è accumulata.

Lo studio *in vivo* del promotore di *rgga*, effettuato mediante saggio GUS, ha dimostrato che il gene è fortemente espresso in radici, in cellule del parenchima vascolare ed in cellule stomatiche. In letteratura è stato recentemente riportato che il trascritto *nced*, codificante per un enzima chiave della biosintesi di ABA, è accumulato specificamente nelle cellule parenchimatice del tessuto vascolare in risposta a stress (Endo et al., 2008). L'attivazione di *nced* è risultata alla base dell'induzione di numerosi geni *stress-responsive* (DREB-L, DREB2A, RAB18, WD40, RD29A) nelle cellule dei fasci, suggerendo per il tessuto vascolare un ruolo di fondamentale importanza nella percezione dello stress idrico e nell'attivazione di meccanismi di risposta locali e sistemici (Endo et al., 2008).

Di particolare interesse è inoltre la localizzazione di *rgga* anche in cellule stomatiche. E' noto che l'apertura e la chiusura delle cellule di guardia regolano i principali scambi gassosi tra pianta ed ambiente esterno e che l'ABA ha un ruolo preminente nella regolazione della chiusura stomatica, limitando un'eccessiva perdita di acqua in condizioni di scarsa disponibilità idrica (Lake et al., 2001).

I risultati ottenuti, evidenziando nel complesso che il gene *rgga* è espresso specificamente in tessuti e cellule critici per la produzione e l'attività dell'ABA, consentono di ipotizzare una probabile correlazione tra l'ormone ABA e l'espressione/attività del gene.

Il profilo di distribuzione della proteina di fusione YFP-RGGA coincide in linea generale con quello di espressione del gene. Le analisi effettuate mediante microscopia confocale hanno, infatti, evidenziato segnali di fluorescenza specifici a livello dell'epidermide della radice primaria, nel parenchima dei fasci vascolari e negli

stomi, suggerendo che RGGGA svolga principalmente la sua attività in queste cellule specializzate. Non è da escludere, comunque, una traslocazione della proteina, attraverso il sistema vascolare, sottoforma di complesso riboproteico per il trasporto di molecole di RNA a lunga distanza.

Particolarmente interessante è sembrata la distribuzione della proteina RGGGA a livello della regione di proliferazione della radice; in tutte le linee analizzate, infatti, non è stata rivelata la presenza di RGGGA in cellule meristematiche. Una più attenta analisi di espressione mediante saggio GUS consentirà di stabilire se nel meristema radicale questo fenomeno è imputabile ad una inibizione trascrizionale di *rgga* o a processi di repressione della sintesi proteica o ad attività proteolitiche. La proteina di fusione RGGGA-YFP, espressa stabilmente in piante transgeniche di *A. thaliana*, localizza prevalentemente nel citoplasma, tendenzialmente nello spazio perinucleare.

I risultati nel complesso suggeriscono che RGGGA svolge il suo ruolo biologico prevalentemente nel lume citoplasmatico. E' ampiamente dimostrato che proteine citoplasmatiche con attività *RNA-binding* sono indirizzate nel nucleo in seguito ad un segnale esogeno. In particolare il gruppo del prof. Assmann ha dimostrato, con un elegante lavoro, che una proteina *RNA-binding* AKP1 è in grado di dirigere, in seguito a trattamento con ABA, il processamento del trascritto di una deidrina; in particolare la AKP1 citoplasmatica era attivata e trasferita nel nucleo da una chinasi AAPK ABA-dipendente dopo trattamento ormonale (Li et al., 2002). Nessuna ri-localizzazione sub-cellulare, comunque, è stata registrata per la proteina di fusione RGGGA-YFP in seguito a trattamenti con NaCl, PEG ed ABA (dati non mostrati). La distribuzione, principalmente citoplasmatica di *rgga*, quindi, fa escludere la sua partecipazione nella trascrizione e nella maturazione dei trascritti, processi questi, tipicamente nucleari.

I risultati ottenuti, sebbene non definiscono in modo univoco il ruolo di *rgga* in *Arabidopsis*, permettono di ipotizzare che la proteina agisca da regolatore positivo nella risposta ABA-dipendente allo stress, determinando un vantaggio in termini di tolleranza/adattamento in condizioni ambientali avverse. L'uso di mutanti in differenti elementi del complesso *pathway* di segnalazione dell'ABA (*aba1*, *abi1*, *abi2*) permetterà di definire il ruolo di RGGGA nei meccanismi di regolazione genica mediati da ABA.

E' possibile, inoltre, ipotizzare che la proteina RGGGA, localizzata prevalentemente nel citoplasma e nello spazio perinucleare, assolva il ruolo di *chaperone* o di trasportatore, proteggendo trascritti importanti per il raggiungimento di una nuova omeostasi cellulare. Un ruolo di stabilizzatore di trascritti chiave nei meccanismi di trasduzione del segnale (gene PAI-1) è stato dimostrato sperimentalmente per la proteina PAI-RBP 1 (Koensgen et al., 2007) che come accennato è omologa a RGGGA (cfr. paragrafo 4.2). Alternativamente, è possibile il coinvolgimento di RGGGA nei processi di destabilizzazione o inattivazione di trascritti che codificano per regolatori negativi dello stress, favorendo in tal modo il ripristino del metabolismo cellulare in condizioni di stress.

Ulteriori studi di interazione RNA-proteina e proteina-proteina sono necessari per definire i partner molecolari con cui RGGGA interagisce e il ruolo di tale interazione per l'attivazione, indotta da RGGGA, di meccanismi adattativi e di tolleranza a condizioni di stress osmotico nei sistemi vegetali.

5 CONCLUSIONI

Le attività svolte in questo lavoro di tesi hanno permesso:

- lo studio del trascrittoma di colture cellulari di patata esposte a stress idrico di breve e lungo periodo mediante tecnologia *microarray*;
- l'analisi funzionale del gene *rgga* nella risposta a stress e nei meccanismi di tolleranza.

I risultati ottenuti nel progetto di dottorato, hanno dimostrato che:

- popolazioni cellulari di *S. tuberosum* in risposta a stress indotto da carenza idrica esibiscono una risposta molecolare molto diversificata, strettamente dipendente dall'intensità e dalla durata dello stress imposto e risultante nell'attivazione di geni con ruoli e funzioni diverse;
- un *subset* di geni, identificati nello studio del trascrittoma in risposta a stress, risultano differenzialmente regolati in tessuti di piante di patata esposte a condizioni di scarsa disponibilità di acqua; l'utilizzo delle colture cellulari in sospensione, quindi, risulta essere uno strumento utile per l'identificazione di geni coinvolti nella risposta fisiologica a livello di pianta;
- il gene *rgga*, identificato nell'analisi del trascrittoma, codifica per una proteina *RNA-binding* (RGGA), molto conservata in diverse specie vegetali, la cui espressione è inducibile da stress osmotici in patata ed in *Arabidopsis*. RGGA, è una proteina prevalentemente citoplasmatica, espressa ad alti livelli nel parenchima vascolare e negli stomi di piante di *Arabidopsis* come evidenziato dall'analisi di espressione *in vivo* del promotore e di localizzazione mediante microscopia confocale;
- La sovraespressione di *rgga* in piante transgeniche di *Arabidopsis* conferisce una maggiore capacità di sopravvivenza in condizioni limitanti di crescita. Il gene *rgga* potrebbe rappresentare, quindi, un componente importante della complessa *machinery* cellulare attivata durante i processi di adattamento/tolleranza a condizioni di stress osmotico.

5 MATERIALE SUPPLEMENTARE

Tabella Supplementare TS1. Lista di geni sovraespressi in colture cellulari di patata esposte a condizioni di *shock* idrico. Nella tabella sono riportati i rapporti di espressione (ratio) trattamento/controllo, il nome dell'EST, il clone utilizzato nel *microarray* e l'annotazione del singolo gene. I geni sono classificati in categorie funzionali secondo il catalogo FunCat. In verde sono evidenziati i geni successivamente analizzati mediante qRT-PCR.

Ratio	EST	Clone	Annotation
			Metabolism
			Metabolic process
4,17	BQ507629	STMGR47	acetyl-CoA synthetase, putative /
2,69	BQ113572	STMCO47	metallo-beta-lactamase family protein
2,59	BQ507944	STMGT47	ATSAC1B/IBS2 (IMPAIRED IN BABA-INDUCED STERILITY 2)
2,06	BQ120311	STMPE95	ATCXE20 (ARABIDOPSIS THALIANA CARBOXYESTERASE 20);
3,65	BQ516895	STMJA47	allyl alcohol dehydrogenase, putative
2,1	BQ504903	STMGA71	aldo/keto reductase family protein
3,89	BQ516292	STMIW95	ALDH22a1 (ALDEHYDE DEHYDROGENASE 22A1)
			Aminoacid metabolism
2,44	BQ117993	STMDW95	ketol-acid reductoisomerase
2,28	STMIY23	P16048	Glycine cleavage system H protein,
3,22	BQ119420	STMJE65	ATCIMS (COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE
2,82	BQ117370	STMDS23	MMT (methionine S-methyltransferase);
2,39	BQ518123	STMJI23	acylaminoacyl-peptidase-related
			Carbohydrate metabolism
2,53	BQ518857	STMJM47	mannitol dehydrogenase, putative
			Fatty acid metabolism
2,03	BQ513644	STMIG65	long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative
3,02	BQ507689	STMGR89	ATLCBK1 (A. THALIANA LONG-CHAIN BASE (LCB) KINASE 1)
3,67	BQ112945	STMCK41	GDSL-motif lipase, putative
2,48	BQ514486	STMIM23	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
2,41	BQ515108	STMIQ17	delta-8 sphingolipid desaturase, putative
			Hormone metabolism
2,21	BQ117090	STMDO47	LEJ1 (LOSS OF THE TIMING OF ET AND JA BIOSYNTHESIS 1)
2,26	BQ516491	STMIY17	BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR 1);
			Nucleic acid metabolism
2,25	BQ119665	STMEL71	RNS2 (RIBONUCLEASE 2)
2,42	BQ504932	STMGA89	ribose-phosphate pyrophosphokinase 4
2,27	BQ511168	STMHP71	uricase / urate oxidase
3,43	BQ117405	STMDS47	aspartate carbamoyltransferase
2,02	BQ516583	STMIY71	PYR4 (PYRIMIDIN 4)
			Secondary metabolism
4,01	BQ111469	STMCA89	terpene synthase/cyclase family protein
			Energy
2,02	BQ517518	STMJE23	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative
5,12	BQ115739	STMDD17	phosphofructokinase family protein
2,12	BQ518190	STMJI65	heme binding / transition metal ion binding
3,14	BQ507590	STMGR23	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal,
2,01	BQ511691	STMHT17	NDC1 (NAD(P)H DEHYDROGENASE C1)
3,04	BQ115076	STMCY41	NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit
			Catalytic process
4,46	BQ111992	STMCE41	chloroplast thylakoidal processing peptidase
4,1	BQ518487	STMJK47	catalytic/ hydrolase, acting on ester bonds
			Information pathways
			Cell cycle and DNA processing
2,02	BQ506183	STMGI71	cell division cycle protein 48, putative / CDC48
			Transcription
2,22	BQ511963	STMHV23	APRR2 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 2)
2,12	BQ511758	STMHT65	COL1 (CONSTANS-LIKE 1)

2,22	BQ510464	STMHK47	GI (GIGANTEA)
2,08	BQ115748	STMDD23	BIM3 (BES1-INTERACTING MYC-LIKE PROTEIN 3)
1,6	BQ510154	STMHI23	SCL1 (SCARECROW-LIKE 1); transcription factor
4,68	BQ112955	STMCK47	PHD finger family protein
2,38	BQ512373	STMHX95	ATBHLH029/BHLH029/FIT1/FRU (FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1)
2,11	BQ111440	STMCA71	DNA-directed RNA polymerase II, putative (RPB10)
2,22	BQ514240	STMIK71	myb family transcription factor
3,43	BQ513596	STMIG17	kelch repeat-containing F-box family protein
			Protein synthesis
2,36	BQ509942	STMHG47	60S ribosomal protein L17 (RPL17A)
4,42	BQ518850	STMJM41	ribosomal protein S6 family protein
			Protein fate (folding, modification and destination)
4,28	BQ121808	STMFA17	protein phosphatase 2C family protein
2,05	BQ119161	STMEH65	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
3,31	BQ518198	STMJI71	c-myc binding protein, putative / prefoldin, putative
2,2	BQ506907	STMGN23	SubName: Full=CG2918-PA (GH11566p) (EG:25E8.1 protein);
3,54	BQ518791	STMJM71	Aha1 domain-containing protein
			Protein with binding function or cofactor requirement
1,91	BQ114262	STMCS71	nucleotide binding
3,63	BQ115464	STMDB23	mRNA-binding protein, putative
2,13	BQ517847	STMJG41	ARAC3/ATROP6/RHO1PS
2,36	BQ120270	STMPE71	polypyrimidine tract-binding protein, putative
2,12	BQ511162	STMHP65	ATP binding / ATP-dependent helicase
2,28	BQ516235	STMIW65	GTP-binding family protein
3,20	BQ509970	STMHG71	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
2,25	BQ119859	STMEN17	AGO2 (ARGONAUTE 2); nucleic acid binding
2,59	BQ113955	STMCC89	transducin family protein
			Transport
3,53	BQ515246	STMIQ95	PIN7 (PIN-FORMED 7)
3,23	BQ514232	STMIK65	importin alpha-2, putative (IMPA-2)
2,28	BQ508931	STMGZ23	mitochondrial substrate carrier family protein
4,23	BQ509995	STMHG95	MATE efflux family protein
3,48	BQ514204	STMIK47	ATATH12 (Arabidopsis ABC transporter homolog 12)
			Perception and response to stimuli
			Cellular communication, signal trasduction mechanism
2,92	BE341142	cSTA16E4	small GTP-binding protein {Lycopersicon esculentum}
2,77	BQ114309	STMCS95	inositol monophosphatase family protein [Arabidopsis thaliana].
2,69	BQ516987	STMJA95	lectin protein kinase family protein
9,43	BQ509032	STMGZ89	UBP1B (OLIGOURIDYLATE BINDING PROTEIN 1B)
2,21	BE471953	cSTA31K11	14-3-3 protein {Solanum tuberosum}
			Cell rescue, defense and virulence
2,11	BQ511700	STMHT23	disease resistance protein (NBS-LRR class)
2,64	BQ519197	STMJO47	ATTRP1 (TELOMERE REPEAT BINDING PROTEIN 1)
2,02	BQ510856	STMHN41	ATTRP1 (TELOMERE REPEAT BINDING PROTEIN 1)
2,77	BQ121067	STMV23	HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8)
2,39	BQ507894	STMGT17	HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8)
2,2	BQ517920	STMJG89	SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)
2,38	BQ515536	STMIS65	ATGSTU8 (Glutathione S-transferase (class tau) 8)
			Interaction with the environment
2,84	BQ120302	STMPE89	auxin-responsive protein-related
			Developmental processes
			Development
2,31	BQ512336	STMHX71	EMB3004/MEE32 (EMBRYO DEFECTIVE 3004); 3-dehydroquinate dehydratase/ NADP binding
2,71	BQ516930	STMJA65	DEK1 (DEFECTIVE KERNEL 1);
3,24	BQ117745	STMDO89	ATROPGEF1/ROPGEF1 (KINASE PARTNER PROTEIN-LIKE);
			Localization
2,45	BQ115776	STMDD41	PDF1 (PROTODERMAL FACTOR 1)
2,63	BQ117209	STMDO17	GC5 (GOLGIN CANDIDATE 5)
			Experimentally uncharacterized proteins
			Classification not yet clear-cut
2,20	BQ513678	STMIG95	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
2,99	BQ511764	STMHT71	MA3 domain-containing protein
6,09	BQ510816	STMHN17	mepirin and TRAF homology domain-containing protein
2,18	BQ118672	STMEC89	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
2,46	BQ117070	STMDO23	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein

2,30	BQ512637	STMHZ65	transferase family protein unclassified proteins
2,48	BQ119680	STMEL89	unknown protein
3,56	BQ119124	STMEH41	unknown protein
2,89	BQ519143	STMJO17	unknown protein
6,99	BQ112998	STMCK71	unknown protein
4,49	BQ119429	STMEJ71	unknown protein
3,03	BQ515849	STMIU41	unknown protein
2,20	BQ517281	STMJC71	unknown protein
4,71	BQ517616	STMJE89	unknown protein
2,48	BQ115502	STMDB47	unknown protein
2,81	BQ115815	STMDD65	unknown protein
2,36	BQ111730	STMCC71	unknown protein
2,05	BQ511413	STMHR41	unknown protein
2,27	BQ508326	STMGV65	unknown protein
2,96	BQ509676	STMHE47	unknown protein
2,14	BQ515465	STMIS23	unknown protein
3,04	BQ114613	STMCV23	unknown protein
4,46	BQ115123	STMCY71	unknown protein
4,73	BQ113278	STMCM47	unknown protein
3,26	BQ119645	STMEL47	unknown protein
4,26	BQ112403	STMCG95	unknown protein
3,75	BQ121615	STMEY95	unknown protein
3,75	BQ116103	STMDF65	unknown protein
2,13	BQ115084	STMCY47	unknown protein
2,96	BQ514857	STMIO65	unknown protein
4,28	BQ121807	STMFA17	unknown protein
2,84	BQ116038	STMDF23	unknown protein
2,27	BQ119618	STMEL17	unknown protein
2,6	BQ117121	STMDO89	unknown protein
3,92	BQ112912	STMCK23	unknown protein
2,39	BQ120216	STMEP41	unknown protein
2,94	BQ117443	STMDS71	unknown protein
2,55	BQ115556	STMDB95	unknown protein
2,36	BQ518523	STMJK65	unknown protein
2,25	BQ513930	STMII71	unknown protein
2,23	BQ111763	STMCC89	unknown protein
2,69	BQ116424	STMDH95	unknown protein
2,85	BQ518817	STMJM23	unknown protein
2,58	BQ114209	STMCS47	unknown protein
2,48	BQ514575	STMIM71	unknown protein
2,06	BQ517809	STMJG17	unknown protein

Tabella Supplementare TS2. Lista di geni sovraespressi in colture cellulari di patata esposte a condizioni di adattamento allo stress idrico. Nella tabella sono riportati i rapporti di espressione (ratio) trattamento/controllo, il nome dell'EST, il clone utilizzato nel *microarray* e l'annotazione del singolo gene. I geni sono classificati in categorie funzionali secondo il catalogo FunCat. In verde sono evidenziati i geni successivamente analizzati mediante qRT-PCR.

Ratio	EST	Clone	Annotation
Metabolism			
Metabolic process			
2,73	BQ120857	STMET55	UGT74B1 (UDP-glucosyl transferase 74B1)
2,87	BQ518861	STMJM49	aldo/keto reductase family protein
3,26	BQ514883	STMIO79	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
3,37	BQ506581	STMGL19	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
2,13	BQ120836	STMET31	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein [
2,43	BQ506563	STMGL07	pectate lyase family protein
2,42	BQ513655	STMIG79	acyl CoA reductase, putative
Aminoacid metabolism			
2,45	BQ112238	STMCG01	ketol-acid reductoisomerase
2,72	BQ516568	STMIY61	adenosylmethionine decarboxylase family protein
2,54	BQ115096	STM CY55	ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2)
2,76	BQ512050	STMHV79	aminotransferase class IV family protein
2,69	BQ511417	STMHR43	ASP1 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 1)
2,03	BQ113588	STMCO49	ATATP-PRT1 (ATP PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE)
2,11	BQ117622	STM DU61	ATCYSD2 (Arabidopsis thaliana cysteine synthase D2)
1,93	BQ112043	STMCE73	ATEYA (ARABIDOPSIS THALIANA EYES ABSENT HOMOLOG);
2,43	BQ509013	STMGZ79	MAT2/SAM-2 (S-adenosylmethionine synthetase 2)
2,77	BQ119363	STM EJ19	OMR1 (L-O-METHYLTHREONINE RESISTANT 1)
Carbohydrate metabolism			
2,98	BQ515239	STMIQ91	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative
2,46	BQ119395	STM EJ49	DPE1 (DISPROPORTIONATING ENZYME)
2,56	BQ120497	STM ER13	fructose-bisphosphate aldolase, putative
3,05	BQ111965	STMCE25	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3B
2,09	BQ112290	STMCG31	starch synthase, putative [Arabidopsis thaliana].
2,76	BQ509633	STMHE19	SUS4 sucrose synthase
Fatty acid/lipid metabolism			
2,41	BQ113014	STMCK79	FAD6 (FATTY ACID DESATURASE 6)
3,05	BQ113947	STM CQ85	HYD1 (Hydra 1)
2,14	BQ508947	STMGZ31	oxysterol-binding family protein
3,87	BQ112012	STMCE55	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
3,15	BQ519189	STMJO43	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
Hormones metabolism			
2,72	BQ118312	STM EA01	ACS12 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12)
2,14	BQ118331	STM EA13	ACS12 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12)
Nucleic acid metabolism			
3,3	AW906734	cSTA4A20	RNA binding protein (RGGA)
2,89	BQ117075	STMDO31	APT1; adenine phosphoribosyltransferase].
2,79	BQ112003	STMCE49	AtSP7 (Anti- silencing function 1a)
2,07	BQ121109	STM EV49	CDA1 (CYTIDINE DEAMINASE 1)
2,21	BQ114672	STM CV61	PRH75 (plant RNA helicase 75)
2,25	BQ505733	STMGG01	DEAD box RNA helicase, putative
2,91	BQ117918	STM DW31	putative RNA polymerase III subunit
Secondary metabolism			
2,63	BQ519231	STMJO67	ATTS1 (Arabidopsis thaliana terpene synthase 1);
6,16	BQ509739	STMHE91	RIF10 (RESISTANT TO INHIBITION WITH FSM 10)
Catalytic process			
2,10	BQ113598	STMCO55	acid phosphatase, putative [Arabidopsis thaliana].
2,84	BQ112708	STMCI91	acid phosphatase, putative [Arabidopsis thaliana].
3,74	BQ112916	STMCK25	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, putative
3,74	BQ511389	STMHR25	BGLU46; hydrolase
3,28	BQ118585	STM EC01	cytosol aminopeptidase family protein
2,78	BQ518400	STMJK01	dehydratase family [Arabidopsis thaliana].
4,42	BQ114708	STM CV85	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein

2,54	BQ516814	STMJA01	hydrolase, alpha/beta fold family protein
2,35	BQ113306	STMCM67	IAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT 3)
2,17	BQ506648	STMGL55	LAF3/LAF3 ISF1/LAF3 ISF2 (LONG AFTER FAR-RED 3)
2,41	BQ519201	STMJO49	peptidase M1 family protein
2,54	BQ515479	STMIS31	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
3,63	BQ517813	STMJG19	seven in absentia (SINA) family protein
2,12	BQ505512	STMGE55	XBCP3 (XYLEM BARK CYSTEINE PEPTIDASE 3)
3,51	BQ516867	STMJA31	FAD-binding domain-containing protein
2,19	BQ512349	STMHX79	thioesterase family protein
			Energy
3,09	BQ510883	STMHN67	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1)
2,05	BQ517295	STMJC79	cytochrome c oxidase family protein
3,03	BQ118384	STMEA49	photosystem II reaction center PsbP family protein
1,81	BQ118364	STMEA37	photosystem II reaction center PsbP family protein
1,93	BQ113279	STMCM49	PSBR (photosystem II subunit R)
2,19	BQ506919	STMGN31	SubName: Full=PTS system, IIA component;
4,09	BQ508697	STMGX79	2-oxoacid-dependent oxidase, putative
2,77	BQ517210	STMJC31	oxidoreductase family protein
1,73	BQ113439	STMCN62	oxidoreductase family protein
2,51	BQ117239	STMDQ55	oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein
3,69	BQ112033	STMCE67	phosphoglycolate phosphatase, putative
3,48	BQ118943	STMEF91	(VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT B2)
3,17	BQ116639	STMDJ91	(VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT D)
			Information pathways
			Cell cycle and DNA processing
2,22	BQ113326	STMCM79	cell division cycle protein 48, putative / CDC48
2,05	BQ505743	STMGG07	DME (DEMETER)
2,05	BQ505744	STMGG07	DME (DEMETER)
5,26	BQ511407	STMHR37	SCC3 (sister-chromatide cohesion protein 3)
2,27	BQ510874	STMHN55	replication factor C 40 kDa, putative
2,25	BQ505855	STMGG73	SUVR4, nuclear histone methyltransferase
5,26	BQ511407	STMHR37	SCC3 (sister-chromatide cohesion protein 3)
			Transcription
2,86	BQ112621	STMCI37	ARF10 (AUXIN RESPONSE FACTOR 10)
1,90	BQ119989	STMEN85	ATRPAC43 (Arabidopsis thaliana RNA polymerase I subunit 43)
2,58	BQ513196	STMID25	calmodulin-binding protein
2,10	BQ506108	STMGI31	CHB3 (Arabidopsis thaliana switch 3D)
2,88	BQ116367	STMDH55	Dof-type zinc finger domain-containing protein
7,17	BQ508155	STMGU68	F-box family protein
2,66	BQ504865	STMGA49	FHY3 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYLS 3)
4,27	BQ514015	STMIJ20	GBF3 (G-BOX BINDING FACTOR 3)
2,29	BQ116304	STMDH07	HAP2A (EMBRYO DEFECTIVE 2220)
2,28	BQ116598	STMDJ37	SPT16 (GLOBAL TRANSCRIPTION FACTOR C);
2,57	BQ507958	STMGT55	STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1)
3,17	BQ115125	STMCIY73	TNY (TINY); DNA binding / transcription factor
26,8	BQ516587	STMIY73	WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40)
2,51	BQ120159	STMPE07	WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40)
2,33	BQ517923	STMJG91	zinc finger (B-box type) family protein
2,62	BQ121038	STMEV01	zinc finger (B-box type) family protein
2,56	BQ511947	STMHV13	zinc finger (CCCH-type) family protein]
2,33	BQ115504	STMDB49	zinc finger (CCCH-type) family protein
2,11	BQ509703	STMHE67	zinc finger (FYVE type) family protein
			Protein synthesis
2,15	BQ513615	STMIG31	EIF2 GAMMA (eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit);
3,48	BQ513282	STMID73	Probable translation initiation factor eIF-2B subunit gamma
2,55	BQ511671	STMHT07	eukaryotic translation initiation factor 2B family protein
2,61	BQ507489	STMGQ68	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2, putative
			Protein fate (folding, modification and destination)
2,80	BQ506626	STMGL43	EBF1 (EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1)
2,13	BQ118833	STMEF07	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein
2,77	BQ517597	STMJE79	UBQ3 (POLYUBIQUITIN 3)
3,25	BQ505929	STMGH20	UCH3; ubiquitin thiolesterase
2,12	BQ506096	STMGI25	SEC (SECRET AGENT)
5,31	BQ507230	STMGP19	ALG3 family protein
2,11	BQ117447	STMDS79	PBB1 (20S proteasome beta subunit B 1)
2,31	BQ118866	STMEF37	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein

2,33	BQ119943	STMEN67	calnexin 1 (CNX1)
3,93	BQ115790	STMDD49	protein prenyltransferase
			Protein with binding function
4,27	BQ116078	STMDF49	AAA-type ATPase family protein
3,32	BQ507909	STMGT25	ACBP4 (ACYL-COA BINDING PROTEIN 4)
1,53	BQ504433	STMJD73	ATARCA (Arabidopsis thaliana Homolog of the Tobacco ArcA
2,12	BQ514502	STMIM31	ATBPM4 (BTB-POZ AND MATH DOMAIN 4); protein binding [
1,78	BQ114687	STMCV73	ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3).
2,17	BQ507937	STMGT43	ATP binding
2,93	BQ116089	STMDF55	ATRBP45C; RNA binding
2,01	BQ507210	STMGP07	binding
2,01	BQ514449	STMIM01	BT1 (BTB and TAZ domain protein 1)
2,71	BQ120189	STMED25	calcium-binding EF hand family protein
2,98	BQ510509	STMHK73	DRT111 (DNA-damage-repair/toleration protein 111)
3,86	BQ507593	STMGR25	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative
2,26	BQ506593	STMGL25	HRB1 (HYPERSENSITIVE TO RED AND BLUE)
4,09	BQ509664	STMHE37	KH domain-containing protein
2,19	BQ517489	STMJE01	KH domain-containing protein NOVA, putative
2,25	BQ513873	STMII25	protein binding / tubulin-tyrosine ligase
3,21	BQ513270	STMID67	RecName: Full=Thioredoxin; Short=Trx;
2,39	BQ504876	STMGA55	RNA recognition motif (RRM)-containing protein [
3,02	BQ510261	STMHJ14	RNA recognition motif (RRM)-containing protein
2,03	BQ514838	STMIO55	S1 RNA-binding domain-containing protein [
2,07	BQ512011	STMHV55	transducin family protein
2,47	BQ117950	STMDD55	transducin family protein /
5,65	BQ120613	STMER85	ATG8F (AUTOPHAGY 8F)
2,01	BQ507947	STMGT49	phosphatidylethanolamine-binding family protein
			Transport
3,11	BQ510521	STMHK79	AAC1 (ADP/ATP CARRIER 1); binding
2,80	BQ116633	STMJD85	ADL6 (DYNAMIN-LIKE PROTEIN 6)
3,70	BQ513879	STMII31	ATGDI2 (RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR 2)
2,35	BQ514777	STMIO07	ATPUP3 (Arabidopsis thaliana purine permease 3
1,71	BQ111354	STMCA19	ATTAP1 (Arabidopsis thaliana transporter associated with antigen processing protein 1)
2,53	BQ119110	STMED31	bile acid:sodium symporter family protein [Arabidopsis thaliana].
2,23	BQ514217	STMII55	CXIP2 (CAX-INTERACTING PROTEIN 2)
4,31	BQ512275	STMHX31	glucose-6-phosphate/phosphate translocator, putative
2,59	BQ119972	STMEN91	MAG1 (MAIGO 1); protein serine/threonine phosphatase [
2,72	BQ518125	STMJI25	magnesium transporter CorA-like family protein (MRS2-7)
3,07	BQ504907	STMGA73	mitochondrial substrate carrier family protein
2,41	BQ120274	STMED73	PIN4 (PIN-FORMED 4); auxin:hydrogen symporter
2,52	BQ513608	STMIG25	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein
11,0	BQ117453	STMDD07	Vacuolar protein sorting-associated protein 27;
2,04	BQ115752	STMDD25	SC3 (SECRETORY CARRIER 3
3,59	BQ515509	STMIS49	SEC14 cytosolic factor family protein
2,92	BQ507274	STMGP43	SUT2 (sucrose transporter 3)
3,55	BQ505877	STMGG85	transferase family protein
3,69	BQ121778	STMFA01	transferase family protein
2,29	BQ513910	STMII49	transmembrane protein, putative
2,4	BQ514155	STMII07	VAP27-2 (VAMP/SYNAPTOBREVIN-ASSOCIATED PROTEIN 27-2);
			Perception and response to stimuli
			Cellular communication, signal trasduction mechanism
4,62	BQ513250	STMID55	AHK3 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3)
2,56	BQ507542	STMGR01	CDPK19 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 19)
2,08	BQ111535	STMCB38	EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4); receptor
2,97	BQ517200	STMJC25	FER (FERONIA)
2,06	BQ508208	STMGV01	lectin protein kinase, putative
3,61	BQ117219	STMDD31	leucine-rich repeat family protein
2,31	BQ119913	STMEN49	leucine-rich repeat family protein
2,12	BQ119440	STMED79	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
2,04	BQ113482	STMEN86	pfkB-type carbohydrate kinase family protein
3,93	BQ113854	STMCC31	pfkB-type carbohydrate kinase family protein
5,06	BQ515178	STMII55	protein kinase family protein
3,24	BQ517915	STMJG85	receptor protein kinase-related
2,16	BQ509007	STMGZ73	thymidine kinase, putative
2,22	BQ111996	STMCE43	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4

3,94	BQ508599	STMGX25	cornichon family protein
			Cell rescue, defense and virulence
3,54	BQ115133	STMCY79	ATOSM34 (OSMOTIN 34)
3,22	BQ513155	STMID01	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)
3,01	BQ518444	STMJK25	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative[
2,15	BQ512657	STMHZ79	disease resistance-responsive family protein
23,2	BQ518456	STMJK31	disease resistance-responsive protein-related
2,38	BQ516178	STMIW31	MLO12 (MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12)
4,33	BQ515885	STMIU61	protease inhibitor, putative
4,71	BQ517796	STMJG07	SYP121 (syntaxin 121); SNAP receptor
3,41	BQ511380	STMHR19	aconitate hydratase, cytoplasmic, putative
2,68	BQ509731	STMHE85	wound-responsive family protein
			Interaction with the environment
2,00	BQ121537	STMEY49	auxin-responsive family protein
2,32	BQ120568	STMER55	dehydration-responsive protein-related
2,26	BQ506680	STMGL73	FRS11 (FAR1-RELATED SEQUENCE 11)
2,58	BQ117374	STMDS25	heat <i>shock</i> protein binding
2,41	BQ118343	STMEA19	HSP81-2 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 8)
5,77	BQ117109	STMDO73	lesion inducing protein-related
4,12	BQ507251	STMGP31	LOS2 (Low expression of osmotically responsive genes 1)
2,46	BQ509645	STMHE25	PHS1 (PROPYZAMIDE-HYPERSENSITIVE 1).
2,31	BQ510238	STMHI79	RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3)
3,28	BQ114645	STMCV43	RCY1 (ARGININE-RICH CYCLIN 1)
3,31	BQ511115	STMHP31	STH2 (SALT TOLERANCE HOMOLOG2)
2,45	BQ119609	STMEL07	TGA3 (TGA1a-related gene 3)
2,37	BQ511767	STMHT73	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7)
3,76	BQ518165	STMJI49	POM1 (POM-POM1); chitinase
3,44	BQ512623	STMHZ55	MLP28 (MLP-LIKE PROTEIN 28)
			Developmental processes
			Biogenesis of cellular components
3,41	BQ515829	STMIU31	ATPMEPCRA; pectinesterase
2,51	BQ111365	STMCA25	pectinesterase family protein
2,25	BQ507263	STMGP37	SKS6 (SKU5 Similar 6); pectinesterase
2,13	BQ518610	STMJL14	SKS6 (SKU5 Similar 6); pectinesterase
3,68	BQ505754	STMGG13	myosin heavy chain-related
			Development
5,25	BQ505113	STMGC01	nodulin MtN3 family protein
4,43	BQ113807	STMCC01	exocyst complex subunit Sec15-like family protein
3,65	BQ511476	STMHR79	NPGR2 (NO POLLEN GERMINATION RELATED 2)
3,63	BQ120875	STMET73	EMB1586 (EMBRYO DEFECTIVE 1586)
3,63	BQ518467	STMJK37	senescence-associated protein-related
2,63	BQ512340	STMHX73	ELF4-L3 (ELF4-LIKE 3)
2,49	BQ513934	STMII73	MEE45 (maternal effect embryo arrest 45)
2,46	BQ511967	STMHV25	TET8 (TETRASPANIN8)
2,21	BQ513922	STMII61	senescence-associated protein, putative
			Localization
112	BQ119901	STMEN43	integral membrane family protein
2,47	BQ512926	STMIB49	integral membrane family protein
2,21	BQ514547	STMIM55	membrane protein, putative
2,15	BQ515563	STMIS79	membrane protein-related
			Experimentally uncharacterized proteins
			Classification not yet clear-cut
2,07	BQ519124	STMJO07	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative
2,27	BQ115467	STMDB25	cupin family protein [Arabidopsis thaliana].
5,95	BQ114720	STMCV91	heavy-metal-associated domain-containing protein
2,28	BQ121547	STMEY55	MLP423 (MLP-LIKE PROTEIN 423)
2,72	BQ506064	STMGI07	prenylated rab acceptor (PRA1) family protein [
3,02	BQ508555	STMGX01	RecName: Full=GRIP1-associated protein 1;
2,96	BQ113814	STMCC07	Serine protease inhibitor 7
1,87	BQ512545	STMHZ07	SubName: Full=Zgc:113227;
3,86	BQ111411	STMCA55	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
			Unclassified proteins
5,17	BQ511485	STMHR85	unknown protein
3,79	BQ511361	STMHR07	unknown protein
2,78	BQ115835	STMDD79	unknown protein
2,25	BQ509971	STMHG73	unknown protein
2,35	BQ507349	STMGP85	unknown protein

5,83	BQ513301	STMID85	unknown protein
2,51	BQ121153	STMEV79	unknown protein
4,09	BQ119174	STMEH73	unknown protein
2,83	BQ506055	STMGI01	unknown protein
2,39	BQ505174	STMGC37	unknown protein
2,66	BQ505214	STMGC61	unknown protein
2,57	BQ113002	STMCK73	unknown protein
2,12	BQ511444	STMHR61	unknown protein
2,14	BQ112374	STMCG79	unknown protein
2,71	BQ519208	STMJO55	unknown protein
3,55	BQ509883	STMHG01	unknown protein
2,05	BQ113548	STMCO31	unknown protein
2,32	BQ511925	STMHV07	unknown protein
3,24	BQ517905	STMJG79	unknown protein
2,82	BQ118612	STMEC31	unknown protein
2,28	BQ112680	STMCI73	unknown protein
5,36	BQ115053	STMCY25	unknown protein
2,35	BQ121828	STMFA31	unknown protein
2,13	BQ509611	STMHE01	unknown protein
2,11	BQ117417	STMDS73	unknown protein
5,71	BQ111707	STMCC55	unknown protein
2,52	BQ512304	STMHX49	unknown protein
6,19	BQ516958	STMJA79	unknown protein
3,83	BQ115525	STMDB73	unknown protein
5,72	BQ515795	STMIU13	unknown protein
7,06	BQ506199	STMGI79	unknown protein
3,41	BQ510943	STMHO14	unknown protein
1,66	BQ111500	STMCB14	unknown protein
2,94	BQ511453	STMHR67	unknown protein
4,37	BQ517821	STMJG25	unknown protein
2,35	BQ113499	STMCO01	unknown protein
2,45	BQ114698	STMCV79	unknown protein
2,51	BQ119144	STMEH55	unknown protein
4,84	BQ116580	STMDJ13	unknown protein
2,16	BQ508588	STMGX19	unknown protein
3,19	BQ511702	STMHT25	unknown protein
2,18	BQ111734	STMCC73	unknown protein
2,77	BQ513638	STMIG55	unknown protein
2,08	BQ507220	STMGP13	unknown protein
2,55	BQ119924	STMEN55	unknown protein
2,26	BQ517886	STMJG67	unknown protein
3,11	BQ513230	STMID43	unknown protein
2,78	BQ508306	STMGV55	unknown protein
2,75	BQ116053	STMDF31	unknown protein
4,19	BQ518775	STMJM07	unknown protein
3,39	BQ117071	STMDO25	unknown protein
1,83	BQ121854	STMFA49	unknown protein
2,41	BQ512791	STMIA62	unknown protein
2,18	BQ116117	STMDF79	unknown protein
2,65	BQ505203	STMGC55	unknown protein
2,65	BQ505204	STMGC55	unknown protein
2,39	BQ121800	STMFA13	unknown protein
4,11	BQ517878	STMJG61	unknown protein
3,66	BQ511736	STMHT49	unknown protein
2,77	BQ508720	STMGX91	unknown protein
2,13	BQ115063	STMCY31	unknown protein
3,08	BQ119375	STMEJ31	unknown protein
2,64	BQ513957	STMII85	unknown protein
2,51	BQ512555	STMHZ13	unknown protein
2,51	BQ114616	STMCV25	unknown protein
2,24	BQ116961	STMMD68	unknown protein
2,94	BQ515518	STMIS55	unknown protein
3,52	BQ518434	STMJK19	unknown protein
2,01	BQ508352	STMGV79	unknown protein
4,25	BQ506637	STMGL49	unknown protein
2,27	BQ114902	STM CX20	unknown protein
2,05	BQ111932	STMCE07	unknown protein

3,43	BQ515552	STMIS73	unknown protein
2,39	BQ506963	STMGN55	unknown protein
2,58	BQ504791	STMGA07	unknown protein
4,25	BQ121087	STMEV37	unknown protein
2,97	BQ513165	STMID07	unknown protein
2,82	BQ112311	STMCG49	unknown protein
5,16	BQ518764	STMJM01	unknown protein
2,07	BQ516910	STMJA55	unknown protein
2,45	BQ507918	STMGT31	unknown protein
2,38	BQ510398	STMHK01	unknown protein
3,85	BQ114662	STMCV55	unknown protein
3,04	BQ120851	STMET49	unknown protein
2,04	BQ510130	STMHI07	unknown protein
2,47	BQ112582	STMCI13	unknown protein
3,51	BQ119136	STMEH49	unknown protein
2,07	BQ112652	STMCI55	unknown protein
2,62	BQ515167	STMIQ49	unknown protein
2,31	BQ516126	STMIW01	unknown protein
2,49	BQ510220	STMHI67	unknown protein
4,45	BQ114177	STMCS31	unknown protein
2,11	BQ112245	STMCG07	unknown protein
2,71	BQ506995	STMGN73	unknown protein
2,36	BQ117976	STMDW79	unknown protein
2,75	BQ509946	STMHG49	unknown protein
4,00	BQ519250	STMJO79	unknown protein
2,18	BQ114266	STMCS73	unknown protein
2,16	BQ507005	STMGN79	unknown protein
2,44	BQ510166	STMHI31	unknown protein
2,54	BQ510198	STMHI55	unknown protein
2,32	BQ120881	STMET79	unknown protein
2,17	BQ118637	STMEC55	unknown protein
4,08	BQ517497	STMJE07	unknown protein
2,21	BQ515905	STMIU73	unknown protein
2,78	BQ512572	STMHZ25	unknown protein
2,86	BQ515862	STMIU49	unknown protein
5,74	BQ509695	STMHE61	unknown protein
5,51	BQ512312	STMHX55	unknown protein
2,02	BQ513633	STMIG49	unknown protein
4,32	BQ114596	STMCV13	unknown protein
3,26	BQ111393	STMCA43	unknown protein
3,92	BQ506605	STMGL31	unknown protein
4,11	BQ512171	STMHW62	unknown protein
2,02	BQ512029	STMHV67	unknown protein
2,61	BQ114211	STMCS49	unknown protein
2,77	BQ514207	STMIK49	unknown protein
2,76	BQ113200	STMCM01	unknown protein

Tabella Supplementare TS3. Lista di geni repressi in colture cellulari di patata esposte a condizioni di *shock* idrico. Nella tabella sono riportati i rapporti di espressione (*ratio*) trattamento/controllo, il nome dell'EST, il clone utilizzato nel *microarray* e l'annotazione del singolo gene. I geni sono classificati in categorie funzionali secondo il catalogo FunCat. In verde sono evidenziati i geni successivamente analizzati mediante qRT-PCR.

Ratio	EST	Clone	Annotation
Metabolism			
174			Metabolic process
0,34	BQ506780	STMGM37	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
0,43	BQ119479	STMKEK13	5-FCL; 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
0,39	BQ116160	STMMDG13	isochorismatase hydrolase family protein
			Aminoacid metabolism
0,22	BQ116186	STMMDG37	ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2); alanine transaminase
0,21	BQ510307	STMHJ37	ATCYSD1 (Arabidopsis thaliana cysteine synthase D1)
0,33	BQ510318	STMHJ43	GLT1 (NADH-dependent glutamate synthase 1 gene)
			Carbohydrate metabolism
0,32	BQ512097	STMHW13	polygalacturonase, putative / pectinase, putative
0,35	BQ111574	STMCB61	transaldolase, putative
			Fatty acid/lipid metabolism
0,12	BQ514003	STMIJ13	KAS I (3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE I)
0,12	BQ516060	STMIV61	lipase class 3 family protein
0,35	BQ519380	STMJP61	triacylglycerol lipase
			Hormone metabolism
0,44	BQ117339	STMDR91	YUC4 (YUCCA4); monooxygenase
			Secondary metabolism
0,32	BQ121876	STMFB13	ATTPS03 (Arabidopsis thaliana terpene synthase 03).
0,43	BQ118540	STMEB61	FPS1 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 1)
0,35	BQ118469	STMEB13	FPS2 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2)
0,16	BQ514703	STMIN61	terpene synthase/cyclase family protein
0,38	BQ516790	STMIZ85	monooxygenase, putative (MO1)
			Energy
0,38	BQ113399	STMCN37	NDC1 (NAD(P)H DEHYDROGENASE C1)
0,22	BQ512204	STMHW85	SRR1 (SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1)
0,41	BQ514095	STMIJ67	acid phosphatase/ oxidoreductase
0,29	BQ506008	STMGH67	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
0,12	BQ514085	STMIJ61	FAD-binding domain-containing protein
			Catalytic process/Proteolysis
0,41	BQ120787	STMES85	ATMDAR1 (MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE 1); monodehydroascorbate reductase (NADH)
0,37	BQ508184	STMGU85	hydrolase, alpha/beta fold family protein
0,29	BQ512140	STMHW43	Serine protease inhibitor 7
Information pathways			
			Cell cycle and DNA processing
0,49	BQ120141	STMEO91	ATHCHIB (BASIC CHITINASE); chitinase
0,31	BQ512826	STMIA85	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein
0,33	BQ519349	STMJP43	RecName: Full=DNA translocase ftsK;
0,40	BQ121261	STM EW61	histone H2B, putative
			Transcription
0,31	BQ514678	STMIN37	AP2 domain-containing transcription factor, putative
0,21	BQ511608	STMHS67	AT-HSFA6B (Arabidopsis thaliana heat <i>shock</i> transcription factor A6B);
0,34	BQ505416	STMGD85	AT-HSFB4 (Arabidopsis thaliana heat <i>shock</i> transcription factor B4)
0,37	BQ508745	STMGY13	CKB3 (casein kinase II beta chain 3)
0,31	BQ111615	STM CB91	DDB1A (UV-damaged DNA-binding protein 1A)
0,37	BQ116976	STM DM85	PAPA-1-like family protein / zinc finger (HIT type) family protein
0,47	BQ113492	STM CN91	polynucleotide adenyltransferase
0,27	BQ514754	STMIN85	SIGB (SIGMA FACTOR B); DNA binding
0,48	BQ120740	STMES61	zinc finger (C2H2 type) family protein
0,29	BQ506871	STMGM91	zinc finger (DHHC type) family protein
			Protein synthesis

0,15	BQ509785	STMHF19	40S ribosomal protein S3 (RPS3C) [Arabidopsis thaliana].
0,44	BQ117876	STMDV91	60S acidic ribosomal protein P3 (RPP3B)
0,40	BQ115658	STMDC67	60S ribosomal protein L10A (RPL10aB)
0,21	BQ119025	STMEG61	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4D)
0,45	BQ117807	STMDV43	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon domain-containing protein
0,50	BQ115689	STMDC85	katanin, putative
0,36	BQ516710	STMIZ43	signal recognition particle 9 kDa protein, putative
			Protein fate (folding, modification and destination)
0,30	BQ114030	STMCR37	seven in absentia (SINA) family protein
0,36	BQ511005	STMHO61	UBP25 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 25)
0,48	BQ513444	STMIF19	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,41	BQ510355	STMHJ67	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,31	BQ505380	STMGD61	STT3B (STAUROSPORIN AND TEMPERATURE SENSITIVE 3-LIKE B);
0,50	BQ119488	STMEK19	shaggy-related protein kinase theta / ASK-theta (ASK8)
0,20	BQ116937	STMDM37	PDF1 (65 KDA REGULATORY SUBUNIT OF PROTEIN PHOSPHATASE 2A);
			Protein with binding function or cofactor requirement
0,41	BQ117283	STMDR19	3'-5' exonuclease domain-containing protein
0,34	BQ508756	STMGY19	ATGB2/ATRAB2C/ATRABB1B (GTP-BINDING 2)
0,50	BQ511046	STMHO85	binding [Arabidopsis thaliana].
0,23	BQ516114	STMIV91	CID11; RNA binding / protein binding
0,30	BQ114106	STMCR85	epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein
0,26	BQ113448	STMCN67	GTP-binding family protein
0,38	BQ113438	STMCN61	oligouridylate-binding protein, putative
0,32	BQ117866	STMDV85	SCL30a (SC35-like splicing factor 30a); RNA binding
0,48	BQ510259	STMHJ13	GIF3 (GRF1-INTERACTING FACTOR 3)
			Transport
0,31	BQ118970	STMEG13	amino acid permease, putative
0,43	BQ120798	STMES91	ATPLT5 (POLYOL TRANSPORTER 5)
0,50	BQ515368	STMIR67	ATPUP11 (Arabidopsis thaliana purine permease 11)
0,30	BQ119584	STMEK85	PIP3 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 3)
0,09	BQ517960	STMJH19	protein transporter [Arabidopsis thaliana].
0,45	BQ519338	STMJP37	YKT61 (similar to yeast SNARE YKT6 1)
			Perception and response to stimuli
			Cellular communication, signal trasduction mechanism
0,20	BQ117798	STMDV37	carbohydrate binding / kinase
0,37	BQ121886	STMFB19	CPK28 (calcium-dependent protein kinase 28)
0,44	BQ113991	STMCR13	leucine-rich repeat family protein
0,42	BQ518740	STMJL85	leucine-rich repeat family protein
0,38	BQ518698	STMJL61	protein kinase family protein
0,46	BQ114979	STM CX67	SRPK4 (SER/ARG-RICH PROTEIN KINASE 4)
0,39	BQ119520	STMEK43	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein
0,45	BQ512835	STMIA91	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
			Cell rescue, defense and virulence
0,38	BQ119513	STMEK37	SGT1B (enhanced downy mildew 1b)
0,30	BQ515316	STMIR37	BGL2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2)
0,27	BQ512747	STMIA37	ATGSTU8 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 8);
			Interaction with the environment
0,21	BQ505347	STMGD43	GASA5 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 5)
0,33	BQ112746	STM CJ19	CYP76C7 (cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 7)
0,49	BQ113411	STM CN43	ATGPX7 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 7)
0,27	BQ121237	STM EW37	ORG4 (OBP3-RESPONSIVE GENE 4)
0,38	BQ120697	STM ES37	RCA (RUBISCO ACTIVASE)
			Developmental processes
			Biogenesis of cellular components
0,30	BQ121988	STM FB85	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
			Development
0,21	BQ511650	STM HS91	FRI (FRIGIDA)
0,41	BQ117320	STM DR67	HEMG2/MEE61 (maternal effect embryo arrest 61)
			Experimentally uncharacterized proteins
			Classification not yet clear-cut
0,34	BQ114041	STM CR43	allergen V5/Tpx-1-related family protein
0,26	BQ117773	STM DV19	balbiani ring 1-related / BR1-related [
0,13	BQ112856	STM CJ85	rhodanese-like domain-containing protein / PPIC-type PPIASE

domain-containing protein			
0,25	BQ514053	STMIJ43	sad1/unc-84 protein-related
0,44	BQ514726	STMIN67	SubName: Full=P70 protein;
0,21	BQ121272	STMEW67	SubName: Full=Putative uncharacterized protein;
unclassified proteins			
0,40	BQ112109	STMCF19	unknown protein
0,35	BQ112138	STMCF37	unknown protein
0,35	BQ112737	STMCJ13	unknown protein
0,32	BQ112814	STMCJ61	unknown protein
0,30	BQ116276	STM DG85	unknown protein
0,46	BQ117300	STMDR43	unknown protein
0,50	BQ117767	STMDV13	unknown protein
0,44	BQ119052	STMEG85	unknown protein
0,46	BQ121910	STMFB37	unknown protein
0,35	BQ121957	STMFB67	unknown protein
0,24	BQ505298	STMGD13	unknown protein
0,32	BQ505918	STMGH13	unknown protein
0,25	BQ506040	STMGH85	unknown protein
0,26	BQ508098	STMGU37	unknown protein
0,22	BQ508110	STMGU43	unknown protein
0,46	BQ508196	STMGU91	unknown protein
0,42	BQ508878	STMGY85	unknown protein
0,45	BQ509797	STMHF37	unknown protein
0,17	BQ509807	STMHF43	unknown protein
0,23	BQ511641	STMHS85	unknown protein
0,49	BQ512132	STMHW37	unknown protein
0,34	BQ512797	STMIA67	unknown protein
0,30	BQ513523	STMIF67	unknown protein
0,45	BQ514127	STMIJ85	unknown protein
0,50	BQ514648	STMIN19	unknown protein
0,28	BQ517382	STMJD37	unknown protein
0,20	BQ518038	STMJH67	unknown protein
0,44	BQ518665	STMJL43	unknown protein
0,42	BQ519391	STMJP67	unknown protein
0,37	BQ111498	STM CB13	unknown protein
0,36	BQ111506	STM CB19	unknown protein
0,14	BQ111578	STM CB67	unknown protein
0,43	BQ112219	STM CF85	unknown protein
0,35	BQ112787	STM CJ43	unknown protein
0,34	BQ113375	STM CN19	unknown protein
0,41	BQ114003	STM CR19	unknown protein
0,30	BQ114900	STM CX19	unknown protein
0,13	BQ114940	STM CX43	unknown protein
0,38	BQ115579	STM DC13	unknown protein
0,45	BQ115649	STM DC61	unknown protein
0,39	BQ116197	STM DG43	unknown protein
0,39	BQ116222	STM DG61	unknown protein
0,25	BQ117278	STM DR13	unknown protein
0,44	BQ117295	STM DR37	unknown protein
0,22	BQ117334	STM DR85	unknown protein
0,41	BQ117831	STM DV61	unknown protein
0,46	BQ117840	STM DV67	unknown protein
0,46	BQ118506	STM EB37	unknown protein
0,28	BQ118550	STM EB67	unknown protein
0,45	BQ119554	STM EK67	unknown protein
0,47	BQ120015	STM EO13	unknown protein
0,23	BQ120054	STM EO37	unknown protein
0,25	BQ120131	STM EO85	unknown protein
0,41	BQ121222	STM EW43	unknown protein
0,31	BQ121299	STM EW85	unknown protein
0,31	BQ121310	STM EW91	unknown protein
0,30	BQ505308	STM GD19	unknown protein
0,44	BQ506048	STM GH91	unknown protein
0,18	BQ507477	STM GQ61	unknown protein
0,22	BQ507531	STM GQ91	unknown protein
0,50	BQ508788	STM GY37	unknown protein
0,24	BQ508832	STM GY61	unknown protein

0,38	BQ508887	STMGY91	unknown protein
0,42	BQ509764	STMHF13	unknown protein
0,27	BQ510347	STMHJ61	unknown protein
0,33	BQ511015	STMHO67	unknown protein
0,44	BQ511069	STMHO91	unknown protein
0,40	BQ511533	STMHS19	unknown protein
0,49	BQ512215	STMHW91	unknown protein
0,37	BQ512716	STMIA13	unknown protein
0,48	BQ512756	STMIA43	unknown protein
0,27	BQ514139	STMIJ91	unknown protein
0,42	BQ515283	STMIR19	unknown protein
0,40	BQ515412	STMIR91	unknown protein
0,50	BQ516654	STMIZ13	unknown protein
0,29	BQ516665	STMIZ19	unknown protein
0,32	BQ517355	STMJD19	unknown protein
0,45	BQ517437	STMJD67	unknown protein
0,27	BQ517469	STMJD85	unknown protein
0,44	BQ518654	STMJL37	unknown protein
0,35	BQ519432	STMJP91	unknown protein

Tabella Supplementare TS4. Lista di geni repressi in colture cellulari di patata esposte a condizioni di adattamento allo stress idrico. Nella tabella sono riportati i rapporti di espressione (ratio) trattamento/controllo, il nome dell'EST, il clone utilizzato nel *microarray* e l'annotazione del singolo gene. I geni sono classificati in categorie funzionali secondo il catalogo FunCat. In verde sono evidenziati i geni successivamente analizzati mediante qRT-PCR.

Ratio	EST	Clone	Annotation
			Metabolism
			Metabolic process
0,45	BQ112086	STMCF07	PDH-E1 ALPHA (PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 ALPHA)
0,48	BQ117730	STMDU80	GAE1 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERASE 1);
0,43	BQ121200	STMEDW15	enolase, putative
0,14	BQ121209	STMEDW21	pyruvate decarboxylase family protein
0,26	BQ120435	STMEDQ70	(S)-2-hydroxy-acid oxidase
0,10	BQ114075	STMCR57	ROC7 (rotamase CyP 7)
0,11	BQ115572	STMDC09	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
			Aminoacid metabolism
0,50	BQ510307	STMHJ37	ATCYSD1 (Arabidopsis thaliana cysteine synthase D1)
0,26	BQ512104	STMHW20	ATAIH/EMB1873 (AGMATINE IMINOHYDROLASE)
0,13	BQ116186	STMDC37	ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2)
0,40	BQ518210	STMJI81	aminotransferase-related
			Carbohydrate metabolism
0,20	BQ115670	STMDC75	malate dehydrogenase (NADP),
0,13	BQ512583	STMHZ31	PME1; pectinesterase inhibitor
0,23	BQ508471	STMGW50	galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein
0,30	BQ120387	STMEDQ43	GAUT14 (Galacturonosyltransferase 14)
0,35	BQ513975	STMII94	ribulose-phosphate 3-epimerase, cytosolic
0,16	BQ118916	STMEDF73	glycoside hydrolase family 28 protein
0,23	BQ514400	STMIL68	aldose 1-epimerase family protein
0,28	BQ506232	STMGJ02	SEX1 (STARCH EXCESS 1)
0,13	BQ509633	STMHE19	SUS4;
0,47	BQ117740	STMDU85	SUS4;
0,18	BQ117791	STMEDV33	SUS4; UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase
0,47	BQ119307	STMED179	EXGT-A4 (ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE A4);
0,45	BQ518978	STMJN22	mannitol dehydrogenase, putative
0,40	BQ113844	STMEDQ26	mannitol dehydrogenase, putative
			Fatty acid/lipid metabolism
0,13	BQ115239	STMEDZ55	ALPHA-DOX1 (ALPHA-DIOXYGENASE 1)
0,38	BQ513101	STMED57	CYP86A1 (cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1)
0,33	BQ515250	STMED01	SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101)
0,16	BQ506796	STMEDM45	phosphatidate cytidyltransferase family protein
0,09	BQ510632	STMEDL62	PLA IVA/PLP1; nutrient reservoir
0,45	BQ509148	STMEDHA69	PLA IVA/PLP1; nutrient reservoir
			Hormones metabolism
0,43	BQ513820	STMEDIH91	ACO1 (ACC OXIDASE 1)
0,18	BQ517783	STMEDJF93	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1);
0,25	BQ121991	STMEDFB87	OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1);
0,16	BQ120669	STMEDS21	OPR2 (12-oxophytodienoate reductase 2);
0,48	BQ112826	STMEDCJ68	OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1);
0,49	BQ513461	STMEDIF28	OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1);
0,26	BQ117145	STMEDDP28	JAI3/JAZ3/TIFY6B (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 3)
			Secondary metabolism
0,12	BQ516451	STMEDIX91	CAD5 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5)
			Nucleic acid metabolism
0,26	BQ120431	STMEDQ68	cyclase family protein [Arabidopsis thaliana].
0,29	BQ120769	STMEDS76	uracil phosphoribosyltransferase
			Catalytic process
0,48	BQ519233	STMEDJO68	(ATSERPIN1); cysteine protease inhibitor
0,19	BQ516543	STMEDIY45	CLPX (Clp protease regulatory subunit X);
0,42	BQ111846	STMEDCD44	SCPL25 (serine carboxypeptidase-like 25);
0,22	BQ112770	STMEDCJ34	AALP (ARABIDOPSIS ALEURAIN-LIKE PROTEASE);
0,15	BQ505124	STMEDGC07	cathepsin B-like cysteine protease, putative

0,49	BQ516462	STMZY02	peptidase M1 family protein
0,17	BQ120757	STMES70	subtilase family protein
0,38	BQ504930	STMGA88	hydrolase
0,17	BQ505674	STMGF63	ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3).
0,41	BQ115155	STMZC10	hydrolase
0,16	BQ111434	STMCA68	ATBCAT-1; catalytic
0,10	BQ113472	STMEN81	GT/UGT74F2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 74F2)
0,33	BQ111693	STMCC45	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
0,10	BQ119085	STMEL13	glycosyl hydrolase family 17 protein
0,21	BQ519147	STMJO20	peroxidase, putative
0,39	BQ119642	STMEL44	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
0,47	BQ512677	STMHZ92	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
0,44	BQ514337	STMIL32	DEG15; endopeptidase
Energy			
0,16	BQ512634	STMHZ63	ATNYE1/NYE1 (NON-YELLOWING 1)
0,04	BQ516160	STMIV21	PMI2 (plastid movement impaired 2)
0,48	BQ515294	STMIR25	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;
0,15	BQ512237	STMHX09	oxidoreductase family protein
0,44	BQ506257	STMGJ19	PGP21 (P-GLYCOPROTEIN 21)
0,19	BQ513742	STMIH39	thioredoxin family protein
0,46	BQ518885	STMJM56	CYP704A2 (cytochrome P450, family 704, subfamily A, polypeptide 2)
0,29	BQ114560	STMCU85	CYP72A8 (cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 8)
0,37	BQ117198	STMMP92	VMA10 (VACUOLAR MEMBRANE ATPASE 10)
0,47	BQ121559	STMAY61	ATPC1 (ATP synthase gamma chain 1)
0,20	BQ118943	STMAY91	(VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT B2)].
Information pathways			
Cell cycle and DNA processing			
0,38	BQ518584	STMJL01	SART-1 family protein [Arabidopsis thaliana].
0,39	BQ508129	STMGU55	cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) family
0,18	BQ508518	STMGW76	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein
0,42	BQ116380	STMDH63	TOPII (TOPOISOMERASE II)
0,07	BQ519349	STMJP43	RecName: Full=DNA translocase ftsK;
0,30	BQ514209	STMIK50	RecName: Full=Retrotransposable element Tf2 155 kDa protein type 3;
0,50	BQ116255	STMDF74	APRR2 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 2); transcription factor [Arabidopsis thaliana].
Transcription			
0,12	BQ117784	STMDV27	IAA9 (indoleacetic acid-induced protein 9)
0,11	BQ511819	STMHU14	zinc finger (DHHC type) family protein
0,43	BQ505364	STMGD52	kelch repeat-containing F-box family protein
0,34	BQ505361	STMGD50	myb domain-containing protein
0,36	BQ510551	STMHL04	XH/XS domain-containing protein
0,13	BQ112694	STMCI81	CLF (CURLY LEAF); transcription factor
0,17	BQ512777	STMIA55	repressor of RNA polymerase III transcription
0,16	BQ121870	STMFB09	WRKY75 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 75)
0,50	BQ517923	STMJG91	zinc finger (B-box type) family protein
0,17	BQ113073	STMCL16	AtTLP10 (TUBBY LIKE PROTEIN 10)
0,30	BQ113817	STMCO09	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
0,32	BQ518202	STMJI74	scarecrow-like transcription factor 8 (SCL8)
0,45	BQ510169	STMHI33	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
0,04	BQ113586	STMCO63	RAP2.12; DNA binding / transcription factor
0,32	BQ112748	STMCI21	transcriptional factor B3 family protein
0,06	BQ112125	STMCF28	homeobox-leucine zipper family protein
0,25	BQ519273	STMJO92	ATBZIP44 (ARABIDOPSIS THALIANA BASIC LEUCINE-ZIPPER 44)
0,07	BQ118963	STMEO07	WRKY54 (WRKY DNA-binding protein 54)
0,17	BQ115117	STMAY67	CDF2 (CYCLING DOF FACTOR 2);
0,24	BQ117087	STMDO44	GATA transcription factor 1 (GATA-1)
1,14	BQ511794	STMHT92	AT-HSFA6B (Arabidopsis thaliana heat <i>shock</i> transcription factor A6B)
0,40	BQ512013	STMHV56	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
0,08	BQ512871	STMIB16	ADA2B (PROPORZ1); DNA binding / transcription factor
0,30	BQ114136	STMCS08	AtTLP1 (TUBBY LIKE PROTEIN 1)
Protein synthesis			
0,44	BQ506881	STMGN03	60S ribosomal protein L6 (RPL6B)
0,39	BQ114257	STMCS68	60S ribosomal protein L31 (RPL31C)
0,35	BQ508396	STMGW08	eukaryotic translation initiation factor SUI1 family protein
Protein fate (folding, modification and destination)			
0,21	BQ114687	STMAY73	ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3).
0,26	BQ512643	STMHZ69	ASHH3 (HISTONE-LYSINE N-METHYLTRANSFERASE ASHH3)

0,11	BQ514990	STMIP44	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein
0,30	BQ517570	STMJE63	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein
0,21	BQ114687	STMCV73	ATJ3 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 3).
0,22	BQ113260	STMCM38	CYP38 (CYCLOPHILIN 38)
0,36	BQ113081	STMCL20	UBQ3 (POLYUBIQUITIN 3).
0,45	BQ514402	STMIL69	phosphate translocator-related
0,06	BQ509988	STMHG87	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)
0,47	BQ518598	STMJL08	phosphatase-related
0,40	BQ511987	STMHV39	S-locus lectin protein kinase family protein
0,36	BQ512731	STMIA28	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,13	BQ516681	STMIZ27	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,45	BQ508444	STMGW34	kelch repeat-containing F-box family protein
0,34	BQ512817	STMIA79	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,44	BQ518166	STMJI50	protein kinase, putative [Arabidopsis thaliana].
0,23	BQ510658	STMHL79	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
			Protein with binding function or cofactor requirement
0,31	BQ113146	STMCL64	lipid-associated family protein [
0,09	BQ515296	STMIR26	lipid-associated family protein
0,28	BQ112776	STMJC37	ATBPM2; protein binding
0,42	BQ512624	STMHZ57	ATBPM2; protein binding
0,20	BQ515877	STMIU57	lipid-associated family protein
0,42	BQ121949	STMFB61	lipid-associated family protein
0,41	BQ505428	STMGD93	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
0,23	BQ514392	STMIL64	ATPP2-B12 (Phloem protein 2-B12); carbohydrate binding
0,32	BQ516648	STMIZ10	zinc-binding family protein
0,13	BQ507070	STMGO21	heavy-metal-associated domain-containing protein
0,04	BQ111568	STMCB58	calcium-binding protein, putative
0,44	BQ112273	STMCG22	binding / protein binding
0,08	BQ510180	STMHI39	heavy-metal-associated domain-containing protein
0,10	BQ518021	STMJH57	calcium ion binding
0,38	BQ518602	STMJL10	RNA recognition motif (RRM)-containing protein
0,50	BQ116926	STMMD25	calmodulin-binding protein-related
0,40	BQ510488	STMHK61	heavy-metal-associated domain-containing protein
0,45	BQ508637	STMGX44	RNA recognition motif (RRM)-containing protein
0,24	BQ519082	STMJN79	binding / protein binding
			Transport
0,43	BQ508288	STMGV46	AtATG18c (Arabidopsis thaliana homolog of yeast autophagy 18)
0,48	BQ507623	STMGR44	LP1 (nonspecific lipid transfer protein 1)
0,17	BQ519000	STMJN34	DIR1 (DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1)
0,41	BQ506615	STMGL37	CAX2 (CATION EXCHANGER 2);
0,05	BQ518919	STMJM88	Sodium/proton antiporter nhaB;
0,14	BQ119966	STMEN79	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family
0,35	BQ509912	STMHG20	mitochondrial substrate carrier family protein
0,47	BQ515949	STMIV08	DELTA-TIP (delta tonoplast integral protein); water channel
0,32	BQ508427	STMGW25	PIP1C (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;3)
0,03	BQ121130	STMEV63	transporter-related
0,29	BQ516624	STMII93	sec34-like family protein
0,27	BQ506315	STMGJ51	sterol carrier protein 2 (SCP-2) family protein
0,42	BQ112869	STMJC93	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
0,37	BQ115987	STMDE88	nuclear movement family protein
0,33	BQ509885	STMHG02	GAMMA-ADAPTIN 1; clathrin binding
			Perception and response to stimuli
			Cellular communication, signal trasduction mechanism
0,09	BQ120779	STMES81	IP5PII (INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE II)
0,39	BQ121930	STMFB50	IP5PII (INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE II)
0,47	BQ116233	STM DG68	IQD32 (IQ-domain 32); calmodulin binding
0,20	BQ514517	STMIM39	TIP41-like family protein
0,06	BQ512150	STMHW49	ATGLR3.3 (Arabidopsis thaliana glutamate receptor 3.3)
0,19	BQ112635	STMCI44	deoxynucleoside kinase family
0,18	BQ512135	STMHW39	protein kinase family protein
0,21	BQ518997	STMJN32	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
0,49	BQ508463	STMGW46	IAA16 (indoleacetic acid-induced protein 16)
0,40	BQ518701	STMJL63	ATHB40/HB-5 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 40)
0,31	BQ118452	STMEA92	ATMPK13 (ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 13)
0,11	BQ118674	STM EC91	SDE3 (SILENCING DEFECTIVE)
0,21	BQ120755	STMES69	protein kinase family protein
0,36	BQ121157	STMEV81	receptor serine/threonine kinase, putative

0,43	BQ119661	STMEL67	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein Cell rescue, defense and virulence
0,41	BQ121995	STMFB93	pathogenesis-related protein,
0,08	BQ117325	STMDR74	CAT2 (CATALASE 2)
0,11	BQ111810	STMCD20	CAT2 (CATALASE 2)
0,30	BQ118345	STMEA20	CAT2 (CATALASE 2)
0,12	BQ510490	STMHK63	disease resistance protein (NBS-LRR class)
0,37	BQ113799	STMCP93	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)
0,35	BQ119745	STMEM40	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)
0,11	BQ515588	STMIS93	endochitinase
0,21	BQ512657	STMHZ79	disease resistance-responsive family protein
0,47	BQ114058	STMCR63	SHM1 (SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 1)
0,11	BQ506335	STMGJ67	ATNRT1:2 (NITRATE TRANSPORTER 1:2)
0,36	BQ509994	STMHG92	ZIF1 (ZINC INDUCED FACILITATOR 1)
0,26	BQ118483	STMEB22	ATAF1 (Arabidopsis NAC domain containing protein 2)
0,45	BQ512747	STMIA37	ATGSTU8 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau)
0,20	BQ512323	STMHX62	ATGSTU8 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau)
0,32	BQ512154	STMHW52	ATGSTU25 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau)
0,04	BQ513685	STMIH03	ATGSTU19 (GLUTATHIONE TRANSFERASE 8);
0,26	BQ515272	STMIR13	ATGSTU19 (GLUTATHIONE TRANSFERASE 8); Interaction with the environment
0,22	BQ113420	STMEN51	nodulin-related
0,25	BQ111893	STMCD74	uridylyltransferase-related
0,35	BQ511994	STMHV43	RD22 (RESPONSIVE TO DESSICATION 22)
0,31	BQ120180	STMEP20	YSL1 (YELLOW STRIPE LIKE 1); oligopeptide transporter
0,41	BQ115693	STMDC87	SNRK2-5/SNRK2.5/SRK2H (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.5)
0,39	BQ120357	STMED26	UGT73B3 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73B3)
0,33	BQ508163	STMGU74	SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)
0,24	BQ120731	STMES55	IAA29 (indoleacetic acid-induced protein 29)
0,50	BQ118260	STMZ61	FSD2 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 2)
0,45	BQ512899	STMIB33	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7)
0,16	BQ508172	STMGU79	RD21 (RESPONSIVE TO DEHYDRATION 21);
0,12	BQ115677	STMDC79	ribonuclease T2 family protein
Developmental processes			
Development			
0,31	BQ514307	STMIL15	XIK (Myosin-like protein XIK); motor/ protein binding
0,25	BQ511941	STMHV09	nodulin MtN3 family protein
0,48	BQ118587	STMED02	brassinosteroid signalling positive regulator-related
0,44	BQ120863	STMET61	CLV1 (CLAVATA 1)
0,27	BQ514151	STMIK02	AHK5 (CYTOKININ INDEPENDENT 2)
0,28	BQ120346	STMED20	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14)
0,33	BQ120656	STMES13	SYNC1 (EMBRYO DEFECTIVE 2755)
0,47	BQ512564	STMHZ19	MEE59 (maternal effect embryo arrest 59)
0,15	BQ114015	STMCR27	EMB1144 (EMBRYO DEFECTIVE 1144)
0,13	BQ504592	STMED22	ATCOQ3 (EMBRYO DEFECTIVE 3002)
0,39	BQ516421	STMIX75	DIS1 (DISTORTED TRICHOMES 1)
0,16	BQ516739	STMIZ58	GIL1 (GRAVITROPIC IN THE LIGHT)
0,38	BQ508529	STMGW82	JAZ1/TIFY10A (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1)
0,13	BQ121469	STMED09	jacalin lectin family protein
0,28	BQ517704	STMJF45	Microtubule-associated protein
Biogenesis of cellular components			
0,44	BQ516531	STMIV39	ADF1 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 1)].
0,08	BQ516083	STMIV75	ATSMC3 (ARABIDOPSIS THALIANA STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 3)
0,17	BQ120708	STMES43	phox (PX) domain-containing protein
0,05	BQ113031	STMCK88	ATARP8 (ACTIN-RELATED PROTEIN 8)
Localization			
Subcellular localization			
0,11	BQ518050	STMJH74	plastid-lipid associated protein PAP, putative [Arabidopsis thaliana].
0,35	BQ517926	STMJG93	integral membrane family protein [Arabidopsis thaliana].
0,31	BQ513750	STMIH45	integral membrane family protein [Arabidopsis thaliana].
0,21	BQ120767	STMES75	Vacuolar proton pump subunit F;
0,23	BQ508379	STMGV94	extracellular dermal glycoprotein, putative
0,34	BQ512427	STMHY32	extracellular dermal glycoprotein, putative
0,10	BQ514118	STMIJ79	FLA9 [Arabidopsis thaliana].
0,29	BQ517643	STMJF08	extracellular dermal glycoprotein, putative
Experimentally uncharacterized proteins			

0,34	BQ518861	STMJM49	aldo/keto reductase family protein
0,21	BQ112808	STM CJ58	alphavirus core protein family
0,23	BQ113059	STMCL09	ANAC014
0,43	BQ116501	STM DI52	BSD domain-containing protein
0,29	BQ114457	STM CU15	cupin family protein
0,48	BQ517998	STM JH44	DC1 domain-containing protein
0,41	BQ512937	STM IB57	early nodulin-related
0,40	BQ515457	STM IS19	GYF domain-containing protein
0,39	BQ516222	STM IW56	RecName: Full=50S ribosomal protein L9;
0,14	BQ513232	STM ID44	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
0,23	BQ119559	STM EK70	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
0,30	BQ519064	STM JN68	hypothetical protein DDB_0237526
0,17	BQ113211	STM CM07	leucine-rich repeat family protein
0,34	BQ112195	STM CF73	MLP423 (MLP-LIKE PROTEIN 423)
0,26	BQ120711	STM ES45	NIR1 (NITRITE REDUCTASE); ferredoxin-nitrate reductase
0,50	BQ120843	STM ET40	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
0,16	BQ506251	STM GJ15	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
0,27	BQ514036	STM IJ32	Per1-like family protein
0,15	BQ512091	STM HW09	PHD finger protein 3;
0,16	BQ514515	STM IM38	serine-rich protein-related [
0,13	BQ116198	STM DG44	SubName: Full=2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase
0,47	BQ510634	STM HL63	SubName: Full=Putative uncharacterized protein VCA0243;
0,10	BQ518283	STM JJ27	tolB protein-related [Arabidopsis thaliana].
0,39	BQ510504	STM HK70	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
			Unclassified proteins
0,46	BQ112005	STM CE50	unknown protein
0,16	BQ112091	STM CF10	unknown protein
0,35	BQ112207	STM CF79	unknown protein
0,37	BQ112662	STM CI62	unknown protein
0,45	BQ112680	STM CI73	unknown protein
0,29	BQ112737	STM CJ13	unknown protein
0,42	BQ113006	STM CK75	unknown protein
0,17	BQ114884	STM CX07	unknown protein
0,38	BQ116328	STM DH22	unknown protein
0,45	BQ116983	STM DM94	unknown protein
0,49	BQ117321	STM DR69	unknown protein
0,42	BQ117767	STM DV13	unknown protein
0,48	BQ119565	STM EK74	unknown protein
0,32	BQ119616	STM EL15	unknown protein
0,37	BQ120810	STM ET03	unknown protein
0,19	BQ121839	STM FA37	unknown protein
0,50	BQ504562	STM DM69	unknown protein
0,40	BQ505633	STM GF37	unknown protein
0,29	BQ506294	STM GJ39	unknown protein
0,43	BQ507435	STM GQ38	unknown protein
0,14	BQ507466	STM GQ55	unknown protein
0,17	BQ509687	STM HE55	unknown protein
0,29	BQ509807	STM HF43	unknown protein
0,24	BQ511641	STM HS85	unknown protein
0,14	BQ512293	STM HX43	unknown protein
0,42	BQ512468	STM HY58	unknown protein
0,48	BQ512759	STM IA45	unknown protein
0,30	BQ512797	STM IA67	unknown protein
0,43	BQ514766	STM IN91	unknown protein
0,42	BQ515070	STM IP91	unknown protein
0,16	BQ515330	STM IR45	unknown protein
0,23	BQ517833	STM JG33	unknown protein
0,10	BQ517851	STM JG43	unknown protein
0,04	BQ517983	STM JH34	unknown protein
0,10	BQ518787	STM JM69	unknown protein
0,10	BQ518787	STM JM69	unknown protein
0,16	BQ518844	STM JM38	unknown protein
0,20	BQ519006	STM JN37	unknown protein
0,49	BQ111533	STM CB37	unknown protein
0,38	BQ111953	STM CE19	unknown protein
0,16	BQ112026	STM CE62	unknown protein

0,13	BQ112430	STMCH15	unknown protein
0,28	BQ112559	STMCH93	unknown protein
0,24	BQ112690	STMCI79	unknown protein
0,45	BQ112858	STMCI86	unknown protein
0,28	BQ112974	STMCK57	unknown protein
0,35	BQ112993	STMCK68	unknown protein
0,09	BQ113125	STMCL51	unknown protein
0,07	BQ113311	STMCM70	unknown protein
0,36	BQ113384	STMCM25	unknown protein
0,09	BQ113474	STMCM82	unknown protein
0,43	BQ113624	STMCO80	unknown protein
0,43	BQ113624	STMCO80	unknown protein
0,41	BQ113662	STMCP08	unknown protein
0,29	BQ113779	STMCP81	unknown protein
0,27	BQ113927	STMCP73	unknown protein
0,40	BQ114225	STMCS50	unknown protein
0,13	BQ114290	STMCS85	unknown protein
0,08	BQ114473	STMCO28	unknown protein
0,06	BQ115171	STMCO30	unknown protein
0,47	BQ115445	STMDB09	unknown protein
0,27	BQ116326	STMDB21	unknown protein
0,28	BQ116334	STMDB25	unknown protein
0,46	BQ117096	STMDO56	unknown protein
0,06	BQ117150	STMDF33	unknown protein
0,39	BQ117167	STMDF52	unknown protein
0,28	BQ117513	STMDF33	unknown protein
0,43	BQ117562	STMDF63	unknown protein
0,08	BQ117572	STMDF69	unknown protein
0,36	BQ117978	STMDF80	unknown protein
0,41	BQ118532	STMFB55	unknown protein
0,29	BQ118545	STMFB64	unknown protein
0,17	BQ118834	STMFB08	unknown protein
0,32	BQ119175	STMFB74	unknown protein
0,12	BQ119473	STMFK10	unknown protein
0,35	BQ120136	STMFO88	unknown protein
0,21	BQ120209	STMFP37	unknown protein
0,37	BQ120232	STMFP51	unknown protein
0,21	BQ120318	STMFO03	unknown protein
0,41	BQ120379	STMFO38	unknown protein
0,21	BQ120751	STMFS67	unknown protein
0,38	BQ120967	STMFU49	unknown protein
0,11	BQ121250	STMFW51	unknown protein
0,08	BQ121281	STMFW74	unknown protein
0,12	BQ504566	STMDF75	unknown protein
0,34	BQ504633	STMED79	unknown protein
0,30	BQ504920	STMGA81	unknown protein
0,21	BQ506042	STMGH86	unknown protein
0,40	BQ506274	STMGJ28	unknown protein
0,08	BQ507005	STMGN79	unknown protein
0,09	BQ507361	STMGP93	unknown protein
0,20	BQ508092	STMGU34	unknown protein
0,46	BQ508153	STMGU67	unknown protein
0,27	BQ508512	STMGW73	unknown protein
0,20	BQ508736	STMGY03	unknown protein
0,36	BQ508812	STMGY50	unknown protein
0,32	BQ508889	STMGY92	unknown protein
0,13	BQ509864	STMHF81	unknown protein
0,11	BQ509993	STMHG91	unknown protein
0,34	BQ510013	STMHH16	unknown protein
0,50	BQ510088	STMHH73	unknown protein
0,33	BQ510138	STMHI13	unknown protein
0,16	BQ510142	STMHI15	unknown protein
0,41	BQ510210	STMHI61	unknown protein
0,42	BQ510559	STMHL40	unknown protein
0,25	BQ511632	STMHS80	unknown protein
0,21	BQ511845	STMHU40	unknown protein
0,05	BQ511872	STMHU57	unknown protein

0,45	BQ512054	STMHV81	unknown protein
0,41	BQ512082	STMHW02	unknown protein
0,38	BQ512182	STMHW70	unknown protein
0,12	BQ512277	STMHX32	unknown protein
0,26	BQ512287	STMHX37	unknown protein
0,20	BQ512632	STMHZ61	unknown protein
0,06	BQ512645	STMHZ70	unknown protein
0,36	BQ512685	STMIA01	unknown protein
0,32	BQ512703	STMIA19	unknown protein
0,31	BQ512722	STMIA16	unknown protein
0,15	BQ512847	STMIB01	unknown protein
0,24	BQ513022	STMIC15	unknown protein
0,21	BQ513124	STMIC79	unknown protein
0,47	BQ513198	STMID26	unknown protein
0,47	BQ513242	STMID50	unknown protein
0,21	BQ513567	STMIF94	unknown protein
0,36	BQ513638	STMIG55	unknown protein
0,15	BQ513677	STMIG94	unknown protein
0,15	BQ513677	STMIG94	unknown protein
0,27	BQ513713	STMIH19	unknown protein
0,43	BQ513761	STMIH52	unknown protein
0,09	BQ514284	STMIL01	unknown protein
0,05	BQ514287	STMIL03	unknown protein
0,07	BQ514412	STMIL75	unknown protein
0,48	BQ514549	STMIM56	unknown protein
0,36	BQ514744	STMIN79	unknown protein
0,47	BQ514863	STMIO68	unknown protein
0,23	BQ515766	STMIT93	unknown protein
0,31	BQ515821	STMIU27	unknown protein
0,06	BQ516048	STMIV55	unknown protein
0,06	BQ516048	STMIV55	unknown protein
0,04	BQ516352	STMIX33	unknown protein
0,06	BQ516393	STMIX57	unknown protein
0,33	BQ516976	STMJA88	unknown protein
0,46	BQ517182	STMJC14	unknown protein
0,37	BQ517384	STMJD38	unknown protein
0,11	BQ517633	STMJF02	unknown protein
0,34	BQ517752	STMJF75	unknown protein
0,22	BQ517790	STMJG01	unknown protein
0,27	BQ517898	STMJG75	unknown protein
0,34	BQ517979	STMJH32	unknown protein
0,10	BQ518149	STMJI39	unknown protein
0,39	BQ518151	STMJI40	unknown protein
0,28	BQ518403	STMJK03	unknown protein
0,38	BQ518831	STMJM31	unknown protein
0,15	BQ518864	STMJM51	unknown protein
0,37	BQ518887	STMJM57	unknown protein
0,29	BQ518915	STMJM86	unknown protein
0,38	BQ519056	STMJN64	unknown protein
0,46	BQ519084	STMJN80	unknown protein
0,17	BQ519092	STMJN92	unknown protein
0,14	BQ519223	STMJO63	unknown protein
0,28	BQ519409	STMJP76	unknown protein

6 BIBLIOGRAFIA

- Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., Van Arkel G., Pereira A., 2004. The shine clade of *ap2* domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2463-2480.
- 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 Mol. Biol.*, 19:781-92.
- Alonso J.M., Stepanova A., Leisse et al., 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301:653-657.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Alvim F.C., Carolino S.M., Cascardo J.C., Nunes C.C., Martinez C.A., Otoni W.C., Fontes E.P. 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.*, 126:1042-1054.
- Ambrosone A., Costa A., Frusciante L., Luigi Monti, Leone A., Grillo S. 2008. Unravelling the molecular cues of plant adaptation or survival to water deficit, *Options mediterraneennes*, A 83 (In Press)
- An G., Jeong D.H., Jung K.H., Lee S. 2005. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol. Biol.*, 59:111-122.
- Baud S, Vaultier MN, Rochat C (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 55: 397-409.
- Bohnert HJ, Gong Q, Li P, Ma S (2006) Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms--getting genomics going. *Curr Opin Plant Biol* 9: 180-188.
- Bohnert H. J., Qingqiu G., Li P., Ma S. 2006. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:180–188.
- Bonetta D., McCourt P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.*, 6:231-235.
- Boudsocq M., Lauriere C. 2005. Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.*, 138:1185-1194.
- Bray E.A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Env.*, 25:153-161.
- Bray E.A. (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55: 2331-2341.
- Capell T., Bassie L., Christou P. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9909-9914.
- Carpenter J. F., Crowe, J. H., Arakawa T. 1990. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state. *J. Dairy Sci.* 73:3627-3636.
- Chak R.K., Thomas T.L., Quatrano R.S., Rock C.D. 2000. The genes *ABI1* and *ABI2* are involved in abscisic acid- and drought-inducible expression of the *Daucus carota* L. *Dc3* promoter in guard cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 210:875-883.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S.Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive

- element binding factors. *J. Biol. Chem.*, **275**:1723-1730.
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Close T.J., Kortt A.A., Chandler P.M.**, 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced protein (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.*, **13**:95-108.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.
- Costa A., Massarelli I., Dragonetti E., Leone A., Grillo S.** 1999. Isolation of genes involved in response to osmotic stress. Proceedings of 14th Triennial Conference of the Europ. Assoc. for Potato Res., Sorrento, Italy, 2-7 May 1999, 44-45.
- Costa A., Perrota G., Ambrosone A., Leone A., Grillo S.** 2005. Microarray analysis for transcriptional profiling of potato cells under abrupt or gradual-adaptive exposure to water stress. Proceeding of Interdrought II, Roma, September 24-28 2005, abstract 6.09.
- Cubellis MV, Wun TC, Blasi F** (1990) Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* **9**: 1079-1085.
- Cushman J.C., Bohnert H.J.** 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**:117–124.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* **33**: 751-763.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616-629
- Fedoroff NV** (2002) RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr Opin Plant Biol* **5**: 452-459.
- Flowers, T.J., Yeo, AR.** (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* **22**: 875-84.
- Fray R.G., Wallace A., Grierson D., Lycett G.W.** 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 Mol. Biol.*, **24**:539–543.
- Fu H, Kim SY, Park WD** (1995) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**: 1387-1394.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B** (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot* **55**: 1445-1454.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L., Fink G.R.** 2001. Drought- and- salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:11444-11149.
- Gendra E, Moreno A, Alba MM, Pages M** (2004) Interaction of the plant glycine-rich RNA-binding protein MA16 with a novel nucleolar DEAD box RNA helicase protein from *Zea mays*. *Plant J* **38**: 875-886.
- Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F.** 2004. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.* **54**; 767-781.
- Grillo S., Leone A., Xu Y., Tucci M., Francione R., Hasegawa P.M., Monti L., Bressan R.A.** 1995. Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiol. Plant.*, **93**: 498-504.

- Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E.** 1990. Turgor-sresponsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.*, **15**: 11-26.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineta O., Thomashow M.F., Zhang J.Z.** 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **130**:639-648.
- Hazen SP, Wu Y, Kreps JA** (2003) Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. *Funct Integr Genomics* **3**: 105-111.
- Heaton JH, Dlakic WM, Gelehrter TD** (2003) Posttranscriptional regulation of PAI-1 gene expression. *Thromb Haemost* **89**: 959-966.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DP** (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* **122**: 1129-1136.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.S.** 2000. Removal of feedback inhibition of gamma-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection from osmotic stress. *Plant Physiol.*, **122**:1129–1136.
- Ingram, J., Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* **47**: 377-404.
- Iturriaga G., Schneider K., Salamini F., Bartels D.** 1992. Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **20**:555-558.
- 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. *Plant J.*, **27**: 325-333.
- Jaglo-Ottosen K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., T. Deits, Thomashow M.F.** 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**: 104-106.
- Kang J.Y., Choi H.I., Im M.Y., Kim S.Y.** 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **14**: 30-57.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 1999. Improving plant drought, salt, and freezng tolerance by gene transfer of a single gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* **17**: 287-291.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G. H., Hu C.A.A., Verma D.P.S.** 1995. Over-expression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, **108**:1387-1394.
- Kim JS, Jung HJ, Lee HJ, Kim KA, Goh CH, Woo Y, Oh SH, Han YS, Kang H** (2008) Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **55**: 455-466.
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O, Kang H** (2007) Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions. *Plant J* **50**: 439-451.
- Kishor P, Hong Z, Miao GH, Hu C, Verma D** (1995) Overexpression of [delta]-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* **108**: 1387-1394.
- Knight H., Knight M.R.** 2001. Abiotic stress signalling path-ways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.*, **6**: 262–267.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.** 1997. Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *Plant J.*, **12**:1067–1078.

- Koensgen D, Mustea A, Klamann I, Sun P, Zafrakas M, Lichtenegger W, Denkert C, Dahl E, Sehoul J** (2007) Expression analysis and RNA localization of PAI-RBP1 (SERBP1) in epithelial ovarian cancer: association with tumor progression. *Gynecol Oncol* **107**: 266-273.
- Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** 2006. Identification of plant stress-responsive determinants in Arabidopsis by large scale forward genetics screens. *J. Exp. Bot.*, **57**:1119-1128.
- 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 Physiol* **130**: 2129-2141.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R.** 1999. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell*, **11**:2283-2290.
- Laporte M. M., Shen B., Tarczynski M.C.** 2002. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J. Exp. Bot.*, **53**:699-705.
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI** (2001) Plant development. Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**: 154.
- Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S** (1994) Comparative Analysis of Short- and Long-Term Changes in Gene Expression Caused by Low Water Potential in Potato (*Solanum tuberosum*) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol* **106**: 703-712.
- Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S** (1994) Adaptation versus *shock* response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum* **92**: 21-30.
- 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.
- Lilius G., Holmberg N., and Bulow L.** 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*, **14**:177-180.
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng CK, Gygi SP, Shimazaki K, Assmann SM** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**: 793-797.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**:1391-1406.
- Ma S, Bohnert HJ** (2007) Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biol* **8**: R49.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S.M., Saito H.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**:242-245.
- Magome H., Yamaguchi S., Hanada A., Kamiya Y., Oda K.** 2004. Dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.*, **37**:720-729.
- Maurel C., Chrispeels M.J.** 2001. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, **125**:135–138.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S.,** 2000. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.*, **123**:439-442.
- McKersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O.** 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant*

- Physiol., **111**:1177-1181.
- Mittler R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, **7**:405-410.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K. Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K.** 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech.*, **15**:15-19.
- Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.*, **42**:657-665.
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiol. Plantar.*, **126**:62-71.
- Neil S.J., Horgan R.** 1985. Abscisic acid production and water relations in wilted tomato mutants subjected to water efficiency. *J. of Exp. Bot.*, **36**:1222-1231.
- Oh S.-J., Song S.-I., Kim Y.-S., Jang H.-J., Kim S.-Y., Kim M., Kim Y.-K., Nahm B.-H., Kim J.-K.** 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.*, **138**:341-351.
- Parinov S, Sundaresan V** (2000) Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 157-161.
- Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jenken M.J.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M.** 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.*, **107**:125-130.
- Pilon-Smits E.A.H., Terry N., Sears Tobin K.H., Van Dun K.**, 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**:313-317.
- Qin F., Sakuma Y., Li J., Liu Q., Li Y.-Q.** 2004. cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.*, **45**:1042-1052.
- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.*, **133**:1755-1767.
- Ramachandran S., Sundaresan V,** 2001. Transposons as a tools for functional genomics. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**:243- 252.
- Ribaut J.M., Jiang C., Gonzalez-de-Leon D., Edmeades G., Hoisington D.A.** 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.*, **94**:887-896.
- Romero C., Belles J.L., Vaja J.L., Serrano R, Cullianez-Marcia F.A.** 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypers include drought tolerance. *Planta*, **201**:293-297.
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkottter M, Mewes HW** (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539-5545.
- Saradhi PP, Alia, Arora S, Prasad KV** (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 1-5.

- Scandalios J.G.** 1997. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radic Biol. Med.*, **23**:471-472.
- Schafleitner R, Gutierrez Rosales RO, Gaudin A, Alvarado Aliaga CA, Martinez GN, Tincopa Marca LR, Bolivar LA, Delgado FM, Simon R, Bonierbale M** (2007) Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiol Biochem* **45**: 673-690.
- 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. *J. Exp. Bot.*, **55**:213-223.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J.** 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.*, **113**:1177-1183.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, **115**:327-334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 217-223
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**:410-417.
- Shou H., Bardallo P., Wang K.** 2004. Expression of Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.*, **55**:1013-1019.
- Sivamani E., Bahieldin A. Wraith J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho T.H.D., Qu R.D.** 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.*, **155**:1-2.
- Smirnoff N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, **125**:27–58.
- Sun S, Yu JP, Chen F, Zhao TJ, Fang XH, Li YQ, Sui SF** (2008) TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *J Biol Chem* **283**: 6261-6271.
- Szekely G, Abraham E, Cseplo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L** (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* **53**: 11-28.
- Takahashi S, Seki M, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Narusaka M, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Mol Biol* **56**: 29-55.
- Tarczynski M., Jenssen R., Bohnert H.J.** 1993. Stress protection in transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, **259**:508-510.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 113-122.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-

- dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:11632-11637.
- 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.
- Valliyodan B., Nguyen H.** 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance. Curr. Opin. Plant Biol., 9:189-195.
- Vasquez-Robinet C, Mane SP, Ulanov AV, Watkinson JI, Stromberg VK, De Koeyer D, Schafleitner R, Willmot DB, Bonierbale M, Bohnert HJ, Grene R** (2008) Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. J Exp Bot 59: 2109-2123.
- Verslues P.E., Zhu J.K.** 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. Biochem. Soc. Trans., 33:375-379.
- Verslues P.E., Bray E.A.** 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. J. Exp. Bot., 57:201-212.
- Vierling E.** 1991. The role of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol., 42:579-620.
- Villalobos M.A., Bartels D., Iturriaga G.** 2004. Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in arabidopsis overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. Plant Physiol., 135:309-324.
- Vinocur B., Altman A.** 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Curr. Opin. Biotech., 16:123-132.
- Walden R., Fritze K., Hayashi H., Mikalashевичs E., Harling H., Schell J.** 1994. Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. Plant Mol. Biol., 26:1521-1528.
- 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 Y., Ying J., Kuzma M., Chalifoux M., Sample A., McArthur C., Uchacz T., Sarvas C., Wan J., Dennis D.T., McCourt P, Huang Y.** 2005. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. Plant J., 43:413-24.
- Wang KL, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell 14 Suppl: S131-151.
- Watkinson JI, Hendricks L, Sioson AA, Heath LS, Bohnert HJ, Grene R** (2008) Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. Plant Physiol Biochem 46: 34-45.
- Weigel D, Glazebrook J** (2002) *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Xiong L., Zhu J.K.** 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell Environ., 25:131-139.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.H.D., 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 Physiol., 110:249-257.
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Yoshida Y.** 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. J. Exp. Bot., 56:975-981.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi M., Urao S., Shinozaki K.** 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in

- Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.*, **33**:217–224.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress. *Plant Cell*, **6**:251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**:781-803.
- Yan J., Wang J., Tissue D., Holaday A.S., Allen R., Zhang H.** 2003. Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an *Arabidopsis* ascorbate peroxidase gene. *Crop Sci.*, **43**:1477-1483.
- Yang C-Y., Chen Y-C., Jauh G.Y., Wang C.-S.** 2005. A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **139**:836-846.
- Zang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.K.** 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.*, **135**:615-621.
- Zang X., Fowler S.G., Cheng H., Lou Y., Rhee S.Y., Stockinger E.J., Thomashow M.F.** 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant .
- Zhu J.K., Shi S., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** 1993. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperon Dna J. *Plant Cell*, **5**: 341-49.
- Zhu J.K., Damsz B., Kononowicz A.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** 1994. A plant vitronectin like extracellular adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. *Plant Cell*, **6**: 393-404.
- Zhu J.K.** 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**:247-73.
- Zhu, J.K.** 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**:441-445.

APPENDICE

Durante il lavoro di tesi ha frequentato il laboratorio della Dott.ssa Ida Ruberti presso l'Università "La Sapienza" Roma, per l'analisi delle piante transgeniche al microscopio confocale (localizzazione proteica) e al microscopio DIC (saggio istochimico del gene *gus*).

Inoltre, ha partecipato al Corso di Formazione GENOPOM per il profilo di "Responsabile di Laboratorio per la filiera Agro-Alimentare" presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-IGV, Portici). Il corso si è articolato in due moduli didattici ed un periodo di stage formativo svolto presso i laboratori della dott.ssa Stefania Grillo dell'Istituto di Genetica Vegetale, CNR-IGV (Portici).

Le attività svolte per il progetto di tesi hanno permesso una pubblicazione su una rivista internazionale e la presentazione dei risultati in convegni nazionali ed internazionali quali:

- **Alfredo Ambrosone, Antonello Costa, Luigi Frusciante, Luigi Monti, Antonella Leone, Stefania Grillo**

Unravelling the molecular cues of plant adaptation or survival to water deficit, 2008. *Options mediterraneennes*, **A 83** (In Press)

- **A. Ambrosone, A. Costa, A. Leone, S. Grillo**

Characterization of a novel potato gene coding for a putative RNA binding protein involved in plant response to water stress. **Proceeding of SIGA., 14-17 September 2008, Padova**

- **Alfredo Ambrosone, Antonello Costa, Luigi Frusciante, Luigi Monti, Antonella Leone, Stefania Grillo**

Unravelling the molecular cues of plant adaptation or survival to water deficit, **proceeding of GRUSI congress "Irrigation in Mediterranean agriculture: challenge and innovation for the next decades", 17-18 June 2008, Naples**

- **Ambrosone A., Costa A., Leone A., Grillo M.S.**

Functional analysis of *sato*, a drought stress responsive gene in potato and Arabidopsis, **proceeding of SIGA, 23-26 Sept. 2007, Riva del Garda**

- **A. Ambrosone, A. Costa, G. Perrotta, A. Leone, M.S. Grillo**

Monitoring gene expression in response to short- and long- term water stress in potato, **Proceeding of Plant Genomics European Meetings, 11-14 Oct. 2006, Venice**

- **A. Ambrosone, A. Costa, G. Perrotta, A. Leone, M.S. Grillo**

Transcriptomic and gene expression analysis during water stress in potato, **proceeding of SIGA, 10-14 Sept. 2006, Ischia (NA)**

- **A. Ambrosone, A. Costa, R. Martinelli, A. Leone, V. De Simone, L. Monti, M.S. Grillo.**

Analisi del trascrittoma di colture cellulari di patata (*Solanum tuberosum*) in risposta a stress idrico, **agli atti del convegno "Giornate Scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita", 15-16 Giugno 2006, Napoli**

- **A. Costa, G. Perrotta, A. Ambrosone, A. Leone, M.S. Grillo**

Microarray analysis for transcriptional profiling of potato cells under abrupt or gradual-adaptative exposure to water stress, **proceeding of the 2nd Solanaceae Genome Workshop. 25-28 Sept 2005, Ischia (NA)**

- **A. Costa, G. Perrotta, A. Ambrosone, A. Leone, M.S. Grillo**

Differential gene regulation in potato cells upon abrupt or gradual acclimation to water stress, **proceeding of Inter-drought II. 24-28 Sept 2005, Rome**

RINGRAZIAMENTI

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

Ringrazio, innanzitutto, il Prof. Luigi Monti, per avermi concesso la possibilità di svolgere le attività del progetto di dottorato presso la sede del CNR-IGV di Portici. Ringrazio vivamente la dott.ssa Stefania Grillo per la sua costante presenza, per il suo sostegno scientifico e morale, ma soprattutto, per avermi trasmesso la tenacia nel perseguire, volta per volta, nuovi obiettivi.

Ringrazio il dott. Antonello Costa, collaboratore insostituibile nelle attività di tesi; lo ringrazio, inoltre, per la sua gentilezza e per la sua infinita disponibilità. Un grazie caloroso alla Prof.ssa Antonella Leone per aver contribuito alla mia crescita formativa, per i continui confronti e le dissertazioni scientifiche.

Desidero, inoltre, ringraziare la dott.ssa Ida Ruberti dell'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR- IBPM (Roma) per avermi gentilmente offerto la possibilità di effettuare gli studi di localizzazione proteica presso la suddetta struttura. Ringrazio il dott. Massimiliano Sassi dell'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR- IBPM (Roma) per la sua professionalità e soprattutto per avermi trasmesso in breve tempo la passione per la microscopia confocale

Ringrazio la dott.ssa Marilù Chusano ed il dott. Nunzio D'Agostino per la proficua collaborazione avviata nell'ultimo periodo di tesi.

Ringrazio infine tutto il gruppo "stress", il mio gruppo. Devo tanto a tutte le persone con cui ho avuto il piacere di collaborare in questi anni; allora grazie alla dott.ssa Giorgia Batelli, la mia prima "maestra" di laboratorio, grazie alla dott.ssa Rossella Fasano per sua inarrestabile simpatia e per avermi insegnato a lavorare con le proteine; grazie alla dott.ssa Roberta Nurcato per la sua instancabile collaborazione e per avermi dato una mano con i milioni di semi di Arabidopsis; grazie alla dott.ssa Imma Massarelli per i suoi utilissimi consigli; Grazie al dott. Paolo Iovieno ed alla futura dott.ssa Annarita Spigno, la mia tesista; ringrazio tutti i ragazzi che son passati nel gruppo "stress".

Ringrazio, anche, tutti i membri dei laboratori del castello che hanno assistito alle continue "invasioni di campo" nell'arco dei tre anni del dottorato;

Ringrazio il "CASTELLO" per avermi ospitato per tutti questi anni.

Ringrazio vivamente la mia famiglia e i mie nonni che hanno sempre creduto in me ed in ciò che faccio.

Ringrazio Valeria per essermi stata vicino in tutto questo periodo, per avermi aiutato nei momenti difficili e per tutti i momenti belli vissuti insieme.