
**BIOTECNOLOGIE VEGETALI PER LO
STUDIO DI GENI DI RESISTENZA
DIRETTA ED INDIRECTA AD INSETTI IN
*SOLANACEAE***

Maria Schettino

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



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



**BIOTECNOLOGIE VEGETALI PER LO
STUDIO DI GENI DI RESISTENZA
DIRETTA ED INDIRECTA AD INSETTI IN
*SOLANACEAE***

Maria Schettino

Dottoranda: Dott.ssa Maria Schettino

Relatore: Prof.ssa Rosa Rao

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

A

Voi miei cari genitori,

Raffaele e Giovanna :

Grazie per questo vostro grande dono!

e

A te, caro Gerardo,

rosa d'oro trapiantata nei giardini di Dio

stretta nel palmo della mano del Grande Re,

tu come angelo protettore

continui ancora a vivere con noi

e attraverso di noi

INDICE

<u>1. RIASSUNTO</u>	pag.	1
<u>2. SUMMARY</u>	pag.	2
<u>3. INTRODUZIONE</u>	pag.	6
3.1 Gli insetti dannosi per le piante.....	pag.	7
3.2 Strategie di difesa delle piante da insetti.....	pag.	8
3.2.1. Meccanismi di difesa diretta.....	pag	8
3.2.1.1. Difese anatomiche.....	pag	9
3.2.1.2. Difese chimiche	pag	9
3.2.2. Meccanismi di difesa indiretta	pag	10
3.3. Strategie di difesa in pomodoro	pag	11
3.3.1 La sistemina.....	pag	12
3.3.1.1 Meccanismi di azione della sistemina	pag	13
3.3.1.2 Il recettore della sistemina	pag	14
3.4 Il gene Mi e la resistenza agli afidi in pomodoro	pag	16
3.5 Scopi della ricerca	pag	16
<u>4. MATERIALI E METODI</u>	pag	19
4.1 Plasmide utilizzato.....	pag	19
4. 2 Trasformazione di <i>E.coli</i>	pag	19
4.2.1 Estrazione e digestione del DNA plasmidico estratto da <i>E. coli</i>	pag	19
4. 3 Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con il plasmide pMZ.....	pag	20
4.3.1 Preparazione del plasmide pMZ.....	pag	20
4.4 Trasformazione genetica della cv di pomodoro “Rio Grande”, con il gene della prosistemina mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ,,,,,,,,,,	pag	21
4.4.1. materiale vegetale.....	pag	21

4.4.2 Preparazione dell'inoculo batterico di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 ed LBA4404.....	pag	21
4.4.3 Rigenerazione e trasformazione genetica con il gene della prosistemia (Prosys) della cv di pomodoro "Rio Grande", sia da espianti cotiledonari che fogliari.....	pag	22
4.5 Trasformazione genetica della cv di pomodoro "Red Setter", con il gene della prosistemia mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag	24
4.5.2 Preparazione dell'inoculo batterico di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	pag	25
4.5.3 Rigenerazione e trasformazione genetica con il gene della prosistemia (Prosys) della cv di pomodoro "Red Setter", da espianti cotiledonari	pag	25
4.5.3.1 Allevamento e propagazione dei trasformanti ottenuti dalla trasformazione della cv "Red Setter"	pag	27
4.6 Screening delle piante trasformate della cv "Red Setter" mediante analisi molecolari.....	pag	27
4.6.1 Estrazione del DNA <i>genomico</i>	pag	27
4.6.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	pag	27
4.7 RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Peaction).....	pag	30
4.7.1 Estrazione dell'RNA totale da foglia.....	pag	30
4.7.2 Quantificazione dell'RNA	pag	30
4.7.3 Sintesi del primo filamento di cDNA	pag	31
4.7.4 Trattamento dell'RNA con DNase I	pag	31

4.7.5 Sintesi del cDNA.....	pag	31
4.7.6 Controllo della sintesi del cDNA.....	pag	31
4.7.7 Real Time RT-PCR	pag	32
4.8 Analisi del <i>locus Mi</i>	pag	32
4.9 Saggi biologici di resistenza ad agenti biotici delle piante transgeniche della cv "Red Setter.....	pag	33
4.9.1 Allevamento di afidi sul genotipo "Red Setter".....	pag	33
4.9.2 Saggi biologici con <i>Alternaria solani</i>	pag	33
4.9.2.1 Preparazione dell'inoculo di <i>Alternaria solani</i>	pag	33
4.10 Incroci per l'ottenimento di linee di pomodoro Mi che sovraesprimono il gene della Prosistemina (PROSYS).....	pag	34
4.10.1 Analisi fenotipica e citologica dei parentali	pag	34
4.10.2 Selezione dei genotipi mediante PCR e analisi CAPS.....	pag	35
<u>5. RISULTATI</u>	pag	38
5.1 Trasformazione genetica del pomodoro per il gene della prosistemina	pag	38
5.1.1 Preparazione del plasmide pMZ.....	pag	38
5.1.2 Trasformazione genetica del pomodoro con il gene della prosistemina della cv Rio Grande (RG).....	pag	38
5.1.3 Trasformazione genetica del pomodoro con il gene della prosistemina della cv Red Setter.....	pag	39

5.2	Screening molecolare delle piante transgeniche della cv di pomodoro Red Setter.....	pag	40
5.2.1	Analisi di espressione della progenie T ₀	pag	41
5.2.2	Caratterizzazione ed analisi di espressione della popolazione T ₁	pag	42
5.3	Saggi biologici	pag	44
5.3.1	Saggi biologici di piante transgeniche RSYS con <i>Alternaria Solani</i>	pag	44
5.3.2	Analisi del <i>locus Mi</i> in piante RSYS.....	pag	45
5.3.3	Saggi biologici di piante transgeniche RSYS con afidi	pag	45
5.4	Incroci	pag	47
5.4.1	Screening molecolare mediante PCR e analisi CAPS de1 ricombinanti ottenuti mediante incroci	pag	47
5.4.2	Valutazione citomorfologica di polipoidi	pag	48
	<u>6.DISCUSSIONE</u>	Pag	52
	<u>7.BIBLIOGRAFIA</u>	Pag	55

1. RIASSUNTO

Il fatto di poter disporre di piante resistenti agli insetti porterebbe ovvi benefici all'uomo (aumento di cibo disponibile) ed all'ambiente in generale (diminuzione dell'uso di insetticidi). Per questo motivo la resistenza agli insetti è un classico obiettivo del miglioramento genetico delle specie agrarie. L'uso delle biotecnologie vegetali oggi consente di superare alcuni limiti del miglioramento genetico tradizionale, dando la possibilità di trasferire geni tra organismi appartenenti non solo a specie e generi diversi ma addirittura a regni diversi. Una strategia attualmente perseguita per l'ottenimento di piante resistenti ad insetti è focalizzata sulla produzione di piante che esprimono geni capaci di attivare le differenti difese endogene tali da esercitare una minore pressione selettiva nei confronti dei fitofagi bersaglio. I meccanismi difensivi attivati dall'instaurarsi di un danno fogliare sono sostanzialmente di tipo diretto ed indiretto. La difesa diretta induce geni i cui prodotti interferiscono con l'alimentazione, il metabolismo, la crescita e la riproduzione dei fitofagi. La difesa indiretta della pianta comporta la produzione, in risposta all'attacco dei fitofagi, di specifici metaboliti volatili (VOC), che risultano attrattivi per i nemici naturali del fitofago (Dicke and Van Loon, 2000; Corrado *et al.*, 2007; Heil, 2008). Nel pomodoro un gene capace di attivare entrambe le strategie di difesa è il gene Prosistemia (*Prosys*), un gene endogeno che codifica per un precursore citosolico, dal cui processamento si origina il peptide Sistemina (*SYS*) che svolge un ruolo fondamentale nella difesa contro lepidotteri attivando numerosi geni. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che il gene *Prosys* attiva in *S. lycopersicum* l'espressione di geni coinvolti nella difesa indiretta (Corrado *et al.*, 2007). Il mio progetto di dottorato ha avuto come obiettivo l'applicazione delle biotecnologie vegetali per lo studio di geni di resistenza diretta ed indiretta nel pomodoro. Tale obiettivo è stato perseguito mediante due approcci sperimentali: la trasformazione genetica via *A. tumefaciens*, per la produzione di piante transgeniche di *S. lycopersicum* che sovraesprimano costitutivamente il gene della prosistemia; realizzazione di incroci finalizzati alla introgressione in diverse cultivar di pomodoro del gene *Prosys*, unitamente al gene *Mi* coinvolto nella difesa diretta contro afidi (Rossi *et al.*, 1998). Sono state ottenute piante transgeniche della cv "Red Setter" di pomodoro e l'analisi di espressione genica dei trasformanti *RSYS*, effettuata sia sulla progenie T₀ che sulla progenie T₁, ha rilevato che presentano livelli di sovraespressione della sistemina stabilmente più alti rispetto al controllo. Il genotipo *RSYS* 24 con il più alto livello di sovraespressione rispetto al controllo, utilizzato in saggi biologici per valutare la resistenza nei confronti del fungo *Alternaria solani* e degli afidi mostra più lenta e ridotta comparsa di sintomi necrotici, e resistenza diretta ad afidi per ridotta longevità degli ospiti afidici. Per verificare mediante incroci, la partecipazione della sistemina in risposte di difesa di tipo diretto ed indiretto, sono state utilizzate come sistema modello per la nostra analisi, piante transgeniche di pomodoro della varietà "Better Boy" (BB) che sovraesprimono costitutivamente il precursore della sistemina sotto l'azione del promotore 35S del CaMV e che includono nel proprio background anche il gene *Mi* di resistenza agli afidi (*Sys+Sys+ MiMi*), ed il corrispondente controllo non trasformato della stessa cv e che non include il gene *Mi* (*Sys-Sys- mimi*) (McGurl *et al.*, 1994). Mediante incrocio, sono state prodotte linee di due cv di pomodoro con diverse combinazioni di due geni allo studio, da utilizzare come sistema modello per lo studio dell'interazione sinergica dei due geni nell'innescare strategie difensive per la resistenza ad afidi.

2. SUMMARY

A considerable part of world agricultural production has been destroyed or made unusable by parasites and pathogens, and it was estimated that 15.6% of these losses resulted from direct and indirect damage of phytophagous insects. Currently pursued a strategy for obtaining plants resistant to insects is focused on the production of plants expressing genes capable of activating the endogenous different defence response that would exert less selective pressure against the herbivores. The defensive strategies enabled by the establishment of leaf damage are direct and indirect type. The directly strategy of defence leads genes whose products interfere with nutrition, metabolism, growth and reproduction of herbivores. The indirect strategy of the plant involves the production, in response the attack of herbivores, of specific volatile compounds (VOC), that attract natural enemies of phytophagi, such as predators and parasitoids. My doctoral project had as its objective the application of biotechnology for the study of genes for resistance directly and indirectly in tomato, and the first special purpose of this research was to study the possibility of increasing both types of defence through over expression in transgenic tomato plants chosen as a model for study of a single gene that is the prosystemin (a gene of tomato capable of interesting defence strategy to *lepidoptera* and aphids), and study mechanisms defence made against phytopathogenic fungi. Another purpose of this research was also to see whether the gene prosystemin increases resistance to aphids using transgenic plants of *Lycopersicon esculentum* cv "Better Boy" (BB), which besides over express constitutively prosystemin of the cDNA under the influence of the CaMV 35S promoter (plants initialled BBS), including its background in the gene Mi-resistant aphids (Sys + + Sys Mimi), and assess whether the presence of both genes, gene Mi and the gene Prosys. May be an interesting defence strategy of tomato by aphids. The prosystemin, the gene Prosys, is a endogenous gene of tomato capable of activating both defence strategies direct and indirect (Ryan and Pearce, 2003; Corrado *et al.*, 2007). The gene Prosys encodes a precursor of 200 aa cytosol from which originates the processing systemin, a peptide of 18 aa rich in proline, which accumulates in the plant in response to injury and mechanical damage, both in the sites directly injured and in a systemic manner in the rest, of the plant where is responsible for the production of proteins defence.

The systemin is obtained by cutting the proteolytic C-terminal region of a polypeptide of 200 amino acids called prosystemin (McGurl *et al.* 1994). In this precursor tomato is encoded by a gene of 4176 bp including 11 exons of which only the last coding for systemin. The prosystemin is expressed constitutively at low level, lacks a signal peptide or other sequences like a division, and it is probably a protein cytosol (Ryan and Pearce, 1998), and was the first peptide found in the plant with the translation function signal as a result of injury (Pearce *et al.*, 1991), and the characteristics of movement and action at low concentrations similar to animal hormones, this is considered the peptide hormone first identified in the plant kingdom (Pearce *et al.*, 2001). In tomato were also identified another 3-glich which processed free protein peptides 15, 18 and 20 amino acids with a defence in response to the wounding and the attacks of the phitofagi, like systemin (Pearce *et al.*, 2003). To explain the release of peptide after wounding were formulated different models, one of them provides for repayment in the cytoplasm of proteolytic enzymes, perhaps resulting from the break of structural's similar like vacuolo or directly from the saliva of insects, which cut the prosystemin. Another theory for the production of prosystemin and the subsequent

processing in constitutive manners so the systemin so produced are seized and released after wounding as has been inferred from the study of transgenic plants that constitutively over express the prosystemin (McGurl et al. 1994). These plants show high levels of systemin cytosol indicating that the production of higher quantities of precursor is associated with an increased amount of systemin that can operate as excess. Another theory is the presence of prosystemin and agents responsible for proteolytic activation in the cytoplasm of cells that are different in contact after wounding (Mc Gurl et al., 1994). The key role of peptide systemin in defence against herbivorous insects as a result of wounds, such as those caused by phitophagi insects , it was found from experiments with transgenic plants casting an antisense construct for this peptide (Orozco-Cardenas et al., 1993). These experiments showed that antisense tomato plants lack the capacity to report on the state long-distance wound and the subsequent activation of genes defence. In fact, for the seriously compromised response to the wounding, these modified plants taken as a model, Lepidoptera larvae of *Manduca sexta* had a growth rate 3 times higher than the control unprocessed. While the biological role of the precursor has not been completely clarified much is known about peptide systemin. The production of SYS is induced locally and systemically from attack of insects chewing and mechanical damage (effect chewing). The systemic action of systemin was confirmed by grafting a plant not transformed (aerial part) on a plant transformed (Radical Party) over expressing the prosystemin (Mc Gurl et al., 1994). The translation of the signal (local and systemic response) involves release of peptide SYS in extremely low concentrations blasting a cascade of events that ultimately, the plant active as arsenals of defence many genes of 3 different categories: anti nutritional proteins, components of the route of signal translocation leading to the production of jasmonic acid proteinases. The first event is the activation of SR160 membrane receptor that binds the systemin and active through the way of protein kinase MAPK, and the elevation of extracellular pH of the medium, a phospholipids membrane. This enzyme releases the linoleic acid substratum that is the departure of octodecanoidi Biosynthetic away, leading to the production of the jasmonic essential for the response to harmful insects, which is responsible for the activation of genes useful against insects such as polyphones oxidise and protease inhibitors (Heil et al., 2008). And this (role of the Sys in defence mechanisms direct) is very well documented in the literature. From previous studies it was shown that in tomato, the response to injury depends on the synthesis of systemin. It is processed from its inactive precursor prosystemin and transported to tissues not injured (Ryan, 2000), which is responsible for the activation of several genes involved in direct defence like the protease inhibitors (McGurl et al.1994). More recent studies have shown that the active gene in tomato Prosys the expression of genes involved in the direct defence as well as directly increasing the production of volatile compounds to the attractiveness of natural enemies of insect pests (Corrado et al., 2007). Over the years '70 in tomato has found an endogenous gene for resistance to nematodes (Mariotti, 2007). It has been demonstrated through experiments in gene cloning and transformation of tomato plants likely that the over expression endogenous gene in addition to resistance to nematodes also confers resistance to aphids, reducing power, fecundity and survival of aphids (Hebert et al. 2007), and this is the first example of gene resistance in plants active against two bodies away phylogenetically (Rossi et al., 1998). It was noted that the Mi gene determines resistance to nematodes during all phenological stages of the plant but resistance to aphids during flowering, that is only in breeding and not at the stage of youth, and that the

constituent over expression of this gene in transgenic plants do not anticipate resistance to aphids, or increases the level of resistance observed during flowering (Goggin et al., 2004). In addition to eggplant plants (*S. melongena*) were transformed with the gene MI endogenous tomato, to verify the level of resistance led to a different tomato Solanaceae, for protection against nematodes that aphids, and we saw that in eggplant only confers resistance to nematodes and not to aphids like even in tomatoes. The resistance to aphids in eggplant requires additional genes that are not conserved between tomato and eggplant (Goggin et al., 2006). The goal of my research project, it is the application of biotechnologies for the study of genes for resistance directly and indirectly in tomato, was pursued by two experimental approaches: the genetic transformation for the production of transgenic plants of *S. Lycopersicum* over express constitutively that the gene prosystemin, a crossings program which purpose is to inserting the gene in two different tomato cultivars , and MI Prosys, the first directly involved in defending against aphids (Williamson et al., 1994; Goggin et al., 2006; Hebert et al., 2007; Martinez de Ilarduya et al., 2003; Rossi et al., 1998) and the second involved in the defence against direct and indirect Lepidoptera and aphids. The research was based in experimenting of regeneration and transformation of cv "Rio Grande" tomato (Caccia et al., 1998; Schettino et al., 1998), two strains of *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404 and EHA105 respectively, for obtaining transgenic tomato plants for the gene Prosys well as cotyledon explants also leaves explants (Mc Cormick et al., 1986; van Roekel et al., 1993; Koornneef et al., 1989); Experiments in regeneration and genetic transformation through the strain of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, from cotyledon explants of tomato cv "Red Setter" with the gene prosystemin (Prosys) for the constitutive expression of related gene products. Excellent results were achieved by experiments transformation of cv Red Setter (Van Roekel et al., 1993), with *A. tumefaciens* strain LBA4404, with an efficiency of transformation of 2.36%. The molecular screening performed on 51 plants of the progeny T₀ putative transformed for the gene systemin, has helped to identify 17 plants actually processed of which 14 plants T₀ over express the prosystemin (RT-PCR). The over expression of prosystemin of T₀ was confirmed in T₁ progeny. From the experiments of genetic transformation via *A. tumefaciens* to produce transgenic plants of *S. lycopersicum* that over express constitutively prosystemin the gene, then was obtained transgenic plants of cv "Red Setter" tomato and analysis of gene expression of transforming RSYS, is performed both on the progeny T₀ and on the T₁ progeny, found that levels of over expression of systemin steadily higher compared to the control of unprocessed cv "Red Setter." After cytological and molecular characterization of transgenic plants obtained the tomato cv "Red Setter", were carried out tests of biological plants processed RSYS over expression the prosystemin against phytopathogenic fungi and aphids. The genotype RSYS 24 marked the highest level of over expression compared to the control used in biological tests to evaluate the resistance against the fungus *Alternaria solani* and aphids show slower and reduced the occurrence of necrotic symptoms, and resistance to aphids for direct reduced longevity of aphids. To check through crossings, the participation of systemin answers in defence of direct and indirect, were used as a model system for our analysis, transgenic tomato plants of the variety "Better Boy" (BB), which constitutively over express the precursor of systemin under the action of the CaMV 35S promoter and that includes in its background the Mi gene for resistance to aphids (Sys + + Sys Mimi), and the corresponding control of not transformed by the same cv and that does not include the gene Mi (Sys-Sys - mimi).

It has been showed that the transformed plants produce the same levels of protease inhibitors of plant under wounding (McGurl et al. 1994). So BBS plants are an excellent model to analyze the capacity of systemin triggering defence strategies against herbivores insects. By crosses between transgenic lines already exist for obtaining lines of tomato Mi that over express the gene prosystemin (Prosys), aimed at studying the combination of several genes for resistance were produced lines of two cv of tomato screened by PCR and CAPS analysis, with different combinations of two genes being studied for use as a model system for studying the interaction of the two genes synergistically triggering defensive strategies for resistance to aphids.

3. INTRODUZIONE

Una considerevole parte della produzione agricola mondiale è distrutta o resa inutilizzabile da parassiti e patogeni, ed è stato stimato che il 15,6 % di queste perdite è dovuto a danni diretti ed indiretti di insetti fitofagi (Oerke *et al.*,1995). L'agricoltura tradizionale negli ultimi 50 anni per far fronte a queste considerevoli perdite, ha adottato programmi di lotta chimica contro insetti fitofagi utilizzando ampiamente insetticidi di sintesi (Pimentel *et al.*,1993), al fine di accrescere o mantenere stabile la produttività di importanti sistemi agricoli come l'agroecosistema pomodoro *Solanum lycopersicum*. Oltre ai conseguenti e ben noti effetti negativi sia sull'ambiente che sulla salute dell'uomo a causa del vasto spettro di azione e di penetrazione all'interno dei vegetali, l'uso prolungato di insetticidi provoca un insieme di conseguenze difficilmente controllabili, quali: insorgenza di resistenze nelle popolazioni degli insetti; l'espansione di popolazioni di fitofagi secondari; decimazione delle specie entomofaghe in luogo delle specie infestanti le quali, dopo un periodo di latenza, riesplodono con maggiore aggressività, mancando il regolatore naturale dell'equilibrio ecosistemico. Un ultimo ed importante aspetto, di ordine strettamente ecologico, deriva dalla decimazione di specie utili al mantenimento degli equilibri biologici (impollinatori, predatori e invertebrati), gli unici in grado di regolare naturalmente le risorse del sistema ambiente, con conseguente riduzione della biodiversità. Queste problematiche hanno fortemente stimolato lo sviluppo di tecniche alternative di controllo degli insetti dannosi, tendenti ad un crescente impiego del mezzo biologico o di strategie a ridotto impatto ambientale (Tremblay, 1999). Uno dei più efficaci metodi di lotta alternativa è la lotta integrata, ovvero l'uso di tutti i mezzi possibili, tra cui il potenziamento del sistema di difesa vegetale attraverso il miglioramento genetico, e cioè l'impiego di piante ospiti resistenti. La genetica classica ha consentito notevoli progressi in questa direzione migliorando le specie coltivate con l'introduzione di geni di resistenza. Tali geni non presenti nella variabilità disponibile nella specie coltivata sono ricercati nelle specie selvatiche affini e da queste trasferite nelle prime mediante incrocio, reincrocio e selezione. Questi metodi di miglioramento tradizionale però presentano limitazioni legate sia alla crescente necessità di reperire nuova variabilità genetica, sia alle difficoltà nel trasferimento di geni utili presenti in specie filogeneticamente distanti, limiti che vengono superati dalle biotecnologie emergenti come nuovo e potente strumento per lo sviluppo di piani di controllo integrato finalizzati ad un aumento della sostenibilità ed eco-compatibilità della difesa fitosanitaria. Il fatto di poter disporre di piante resistenti agli insetti porterebbe ovvi benefici all'uomo (aumento di cibo disponibile) ed all'ambiente in generale (diminuzione dell'uso di insetticidi). Per questo motivo la resistenza agli insetti è un classico obiettivo del miglioramento genetico delle specie agrarie. La biotecnologia basata sulla manipolazione del DNA al di fuori degli organismi viventi, è una potente applicazione della tecnologia che consente agli scienziati di isolare geni da un organismo ed inserirli in un altro, per produrre un organismo con nuove caratteristiche. Prima di questi sviluppi, i miglioramenti genetici vegetali erano limitati a scambi genetici tra specie sessualmente compatibili. Ora gli scienziati possono trasferire geni, quindi caratteri ereditabili, tra organismi molto diversi. Questa capacità definita ingegneria genetica, ha rivoluzionato la genetica agraria. L'ingegneria genetica si propone infatti oggi, come metodo che consente di superare alcuni limiti del miglioramento genetico tradizionale dando la possibilità di trasferire geni tra organismi appartenenti non solo a specie e generi diversi ma

addirittura a regni diversi. Le biotecnologie rappresentano un validissimo strumento per creare nuova variabilità genetica ed in particolare per potenziare e manipolare i meccanismi di difesa contro insetti fitofagi. Dallo studio delle relative interrelazioni pianta-insetti è nato lo stimolo e la possibilità di individuare nuovi geni e molecole di origine vegetale utili per il contenimento dei fitofagi, ed anche geni che giocano un ruolo nell'attrazione verso gli entomofagi dei fitofagi dannosi. Questo approccio può far comprendere meglio i meccanismi di resistenza delle piante, come aumentare la variabilità genetica ed incrementare la biodiversità di importanti agroecosistemi come il pomodoro, pianta modello per eccellenza.

3.1 Gli insetti dannosi per le piante

Gli insetti sono organismi ubiquitari tra i più antichi abitanti delle terre emerse, la cui comparsa sulla Terra risale a centinaia di milioni di anni fa come attestano molti reperti fossili. In questo lunghissimo periodo di tempo, la selezione naturale ha permesso loro di evolversi in una tale varietà di forme da poter colonizzare qualsiasi tipo di ambiente ove vi sia materiale organico da utilizzare. Gli insetti sono organismi presenti negli ecosistemi complessi, ove svolgono ruoli essenziali per le catene trofiche rappresentandone numerosi anelli e permettendo all'intero ecosistema di esistere. Infatti nelle catene trofiche gli insetti predatori controllano la popolazione degli insetti dannosi, gli impollinatori favoriscono la riproduzione di alcune piante ed inoltre alcuni insetti producono sostanze utili. Nel corso del processo evolutivo gli insetti hanno sviluppato diverse strategie di alimentazione tra cui la fitofagia. Attualmente sono state identificate circa 500000 specie di insetti che si nutrono di piante, di cui solo il 5% attacca piante utilizzate dall'uomo. Gli insetti dannosi per le piante vengono comunemente suddivisi in due categorie: fitofagi e fitomizi (Tremblay, 1999). I fitofagi sono insetti che possiedono un apparato boccale masticatore in grado di tritare i tessuti vegetali grazie alla presenza di mandibole. Essi causano danni paragonabili a quelli meccanici, quali ad esempio ferite e lacerazioni dei tessuti. I masticatori, inoltre, portano ad una forte diminuzione della biomassa vegetale e quindi ad una drastica riduzione dell'attività biosintetica e ad un notevole incremento della respirazione della pianta. Ai masticatori appartengono essenzialmente la maggior parte delle larve di lepidotteri. Gli insetti fitomizi, invece, possiedono un apparato boccale pungente-succhiatore in cui mandibole e mascelle sono fuse per formare un sottile astuccio flessibile che contiene due canali. Il canale alimentare è utilizzato per ingerire fluidi di origine vegetale, mentre quello salivare serve per rilasciare saliva all'interno dello stiletto e nel sito di alimentazione (Tremblay, 1999). A questa seconda categoria appartengono insetti dell'ordine *Emittera* come afidi e tripidi. Essi stabiliscono dei siti di alimentazione che possono essere utilizzati anche per intere settimane. Quindi, nel breve periodo, i fitomizi producono danni molto limitati ai tessuti vegetali, ma sono capaci di sottrarre ingenti quantità di linfa elaborata alla pianta attaccata privandola, quindi, di tutti i composti necessari per la crescita, lo sviluppo e la riproduzione. I fitomizi possono essere suddivisi in floemomizi, xilemomizi e parenchimomizi a seconda che traggano nutrimento rispettivamente dal floema, dallo xilema e dal parenchima. I fitomizi sono insetti temibili perchè oltre al danno diretto consistente nella sottrazione di linfa, causano anche danni indiretti quali trasmissione di fitopatie dovute a virus e micoplasmi, è nota ad esempio, la trasmissione del CMV dagli afidi in pomodoro, che può comportare la distruzione di interi raccolti.

3.2 Strategie di difesa delle piante da insetti

Gli organismi autotrofi hanno evoluto sofisticate strategie di difesa per poter sopravvivere alle avversità biotiche naturali degli attacchi numerosi e sempre incombenti di individui eterotrofi. Per proteggersi da agenti biotici di varia natura attuano misure difensive per bloccare l'attacco esterno con costo metabolico ed energetico che non comprometta la loro vitalità e capacità riproduttiva. Gli attacchi possono essere condotti da agenti che sono distribuiti su scala dimensionale che va dai funghi unicellulari agli animali superiori; questi agenti hanno modalità di attacco differenti causando danni e sollecitazioni differenti alla pianta. In caso di attacco di microrganismi come funghi e batteri vengono messe in atto diversi sistemi di difesa. Di particolare rilievo è la HR (*Hypersensitive Response*) che si manifesta con la produzione di sostanze antimicrobiche da parte delle cellule situate nell'intorno del sito di infezione. A seguito di complesse interazioni molecolari, tali cellule possono andare incontro ad una strategia di morte programmata, simile all'apoptosi delle cellule animali (Shaffer *et al.*, 2001), per ridurre la diffusione del patogeno. La risposta ipersensibile, efficiente meccanismo di difesa delle piante contro gli attacchi microbici, diventa invece una strategia di difesa parzialmente efficace contro gli attacchi di insetti, in quanto utilizzabile solo contro una tipologia di insetti sedentari che attaccano particolari tessuti come gli afidi floemomizi (Miles, 1999), mentre non ha alcun effetto contro gli insetti che liberi di muoversi, aggirano la HR spostandosi su un altro sito di alimentazione. L'HR non rappresenta una risposta universale delle piante in quanto per proteggersi contro l'attacco di artropodi utilizzano altri innumerevoli meccanismi di difesa acquisiti nel corso dell'evoluzione. I processi co-evolutivi hanno generato una grande complessità e diversità dei meccanismi molecolari nell'interazione pianta-insetto fitofago (Walling, 2000) che possono essere suddivisi in due meccanismi difensivi attivati dall'instaurarsi di un danno fogliare : difesa diretta e difesa indiretta.

3.2.1. Meccanismi di difesa diretta

La strategia della difesa diretta attua meccanismi che hanno lo scopo di contrastare il normale svolgimento del ciclo biologico dell'insetto e che influenzano negativamente la sua performance, inducendo geni i cui prodotti sono sostanze che hanno un'azione direttamente tossica sull'insetto in quanto interferiscono con l'alimentazione, il metabolismo, la crescita e la riproduzione dei fitofagi. Tali meccanismi comprendono sia le difese anatomiche pre-esistenti, che la produzione di composti chimici *ex novo*. I meccanismi di difesa diretta possono pertanto essere espressi sia in maniera costitutiva che inducibile, cioè in seguito a stress. Le risposte inducibili hanno un costo maggiore per le piante in termini di riduzione di crescita, respirazione, biosintesi e crescita rispetto a quelle costitutive (D. Cipollini *et al.*, 2003; Zangerl, R.A., 2003). Questa teoria è stata confermata da esperimenti in cui è stata osservata una riduzione di fitness delle piante esprimenti questi meccanismi inducibili in assenza di stress biotici (D. Cipollini *et al.*, 2003; Redman *et al.*, 2001). Per tanto le piante nel corso dell'evoluzione hanno acquisito sistemi, come l'induzione genica, per attivare queste risposte solo quando sono necessarie e per ridurre i costi della difesa (Heil M and Baldwin, 2002).

3.2.1.1. Difese anatomiche

La difesa diretta è una strategia che si esplica costitutivamente con la presenza di barriere fisiche che impediscono l'accesso alle sostanze nutritive e la colonizzazione dell'insetto (antixenosi). Alcuni esempi di antixenosi sono: la presenza e lo spessore della cuticola, la presenza di spine e tricomi che impediscono l'accesso ai tessuti, la presenza sulla propria superficie di peli ghiandolari la cui rottura da parte dell'insetto determina la liberazione di sostanze tossiche, la deposizione di strati di lignina che determinano l'indurimento della parete cellulare, o di cutina e cere che rendono gli strati epidermici resistenti alle abrasioni, inclusioni cristalline di silicio nella parete vegetale che danneggiano gli apparati boccali masticatori, dotti latticiferi che circondano le cellule e producono sostanze che imbrattano gli insetti rallentandone i movimenti (Tremblay, 1999). L'antixenosi costituisce per la pianta una difesa costitutiva, sempre presente e attiva, una risposta che anticipa l'attacco degli insetti ed è perciò considerata il primo sistema di difesa attuato dalle piante contro gli erbivori.

3.2.1.2. Difese chimiche

Oltre ad attuare un meccanismo di difesa costitutivo come l'antixenosi, che è considerato appunto la prima strategia di difesa innescata in risposta all'attacco di insetti, la pianta può adottare un'altra tipologia di difesa diretta che porta a morte l'insetto e prende il nome di antibiosi, caratterizzata dalla produzione di sostanze tossiche che agiscono in maniera diretta ed in vario modo sul ciclo biologico dell'insetto. Queste sostanze possono essere prodotte in seguito all'attacco degli insetti o sono metaboliti già presenti nei tessuti vegetali e sono generalmente raggruppate in base al loro meccanismo d'azione in antinutritivi e antidigestivi (Duffey e Stout 1996). Gli antinutritivi sono sostanze che impediscono o rallentano il processo di alimentazione dell'insetto rallentandone contemporaneamente la crescita e lo sviluppo. Antinutritivi indotti da ferita e da insetti sono le polifenolossidasi (PPO), enzimi che catalizzano l'ossidazione di composti fenolici in chinoni altamente reattivi che legandosi ai gruppi sulfidrilici di alcuni amminoacidi riducono la disponibilità di proteine vegetali per l'alimentazione degli insetti. Altri composti antinutritivi sono: le lectine, proteine presenti nei tessuti di accumulo, che si legano ai carboidrati riducendone la disponibilità per l'alimentazione degli insetti; il DIMBOA (2,4 diidrossi-7 metossi-1,4 benzoxazine-3 one), un metabolita tossico presente nei tessuti vegetali di piante giovani di mais come coniugato del glucosio, che viene scisso dalla saliva degli insetti in glucosio e 6-MBOA che risulta altamente tossico per le larve di *Ostrinia nubilalis*, un insetto che attacca il mais; metaboliti secondari come i tannini presenti nella parete cellulare, alcuni composti alcaloidi come la nicotina prodotta nelle radici e trasportata attraverso lo xilema nelle foglie dove esplica un'azione tossica ed il gossipolo che, conservato in ghiandole fogliari, si lega alle proteine rendendole indisponibili per la digestione da parte dell'insetto (Duffey e Stout, 1996). La più importante classe di proteine antidigestive è, invece, costituita dagli inibitori di proteasi (PI). Tali proteine, tipicamente prodotte dal danno meccanico in seguito all'attacco da parte dell'erbivoro, accumulandosi nei tessuti vegetali, si legano alle proteasi digestive presenti nel suo intestino. L'inibizione dei principali enzimi coinvolti nella digestione degli insetti fitofagi, riduce sensibilmente l'assimilazione degli aminoacidi essenziali per gli insetti e, quindi, il rallentamento della crescita dell'insetto (Lawrence e Koundal, 2002). In letteratura sono riportati moltissimi

esempi della sovraespressione locale e sistemica di inibitori di proteasi in seguito a ferita e all'attacco di insetti (Gatehouse, 2002) e dell'utilizzo dei geni codificanti tali inibitori per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti ad insetti.

3.2.2. Meccanismi di difesa indiretta

Oltre ai meccanismi di difesa diretta sviluppati nel corso dell'evoluzione, le piante possono adottare strategie difensive indirette senza svolgere la loro azione antiparassitaria direttamente sull'attività dei fitofagi, ma coinvolgendo un terzo livello trofico costituito dai nemici naturali degli insetti dannosi, parassitoidi e predatori che sono attratti e indotti alla predazione dalle piante, in modo da tenere sotto controllo la popolazione degli insetti dannosi (Karban e Baldwin, 1997). La difesa indiretta della pianta comporta infatti la produzione, in risposta all'attacco dei fitofagi, di composti organici volatili (VOC), che risultano attrattivi per i nemici naturali del fitofago, artropodi predatori e parassitoidi, sia da esperimenti condotti in laboratorio (Dicke and Van Loon, 2000), che in condizioni naturali (Kessler and Baldwin, 2001). La pianta in seguito all'attacco di erbivori produce sostanze volatili come etilene, fenilpropanoidi, metil-jasmonato (MeJA), composti a sei atomi di carbonio (detti volatili C₆) (Paré e Tumlinson, 1999; Dicke et al. 1990), terpenoidi (Schmelz *et al.*, 2001) ed in alcuni casi (ad esempio per i membri della famiglia delle *Brassicaceae*) glucosinolati (Halkier e Du, 1997). Tutti questi composti volatili vengono generalmente definiti come VOC (Volatile Organic Compounds), emessi da una pianta sana o infestata vengono utilizzati dagli erbivori per discriminare tra piante ospiti e non-ospiti e per valutare la densità degli insetti in alimentazione presenti sulla pianta (Bolter *et al.* 1997; Quiroz *et al.* 1997), ma il loro rilascio da parte della pianta attaccata è importante soprattutto perché la pianta svolge la sua azione antiparassitaria coinvolgendo un terzo livello trofico costituito dai nemici naturali degli erbivori. La difesa indiretta della pianta comporta infatti la produzione, in risposta all'attacco dei fitofagi, di specifici metaboliti volatili (VOC), che risultano attrattivi per i nemici naturali del fitofago (Dicke and Van Loon, 2000). La conoscenza a livello molecolare di queste interazioni multitrofiche apre nuove opportunità di protezione delle piante mediante controllo biologico, che sarà tanto più efficace quanto più forte risulterà l'attrattività verso gli antagonisti naturali entomofagi. La risposta ai VOC del terzo livello trofico è altamente specifica, infatti gli imenotteri parassitoidi attratti dall'emissione di questi volatili riescono a localizzare insetti o larve loro ospiti (Turlings e Benrey, 1998), e analogamente anche alcuni predatori vengono attratti da questi composti (Kessler e Baldwin, 2001). I predatori generalisti sono di solito attratti da un solo composto presente nelle miscele dei volatili che sono comunemente emessi in seguito all'attacco da parte di varie specie di erbivori (De Moraes *et al.*, 2001). E' stato inoltre dimostrato che la pianta in risposta all'attacco di erbivori innesca i suoi arsenali di difesa, non solo producendo sostanze volatili ma aumentando anche la produzione di nettare extraflorale ad alto contenuto di zuccheri e amminoacidi (Agrawal e Rutter, 1998) per attirare insetti parassitoidi e predatori ed incoraggiarne così la predazione nelle vicinanze delle parti della pianta in cui viene prodotto (Heil *et al.* 2001). Oltre a questa funzione i VOC svolgono anche un ruolo difensivo impedendo l'ovideposizione degli insetti dannosi (De Moraes *et al.*, 2001), e inoltre è stato ipotizzato che i VOC abbiano un ruolo importante anche nelle interazioni pianta-pianta (Farmer, 2001; Heil M and Kost, 2006).

Affinché i meccanismi di difesa inducibili sia diretti che indiretti siano attivati, le cellule vegetali devono essere allertate da segnali definiti genericamente elicitori. Elicitori specifici di insetti erbivori sono stati identificati ed isolati da secrezioni orali di larve di lepidotteri e nei fluidi di ovideposizione di alcuni coleotteri, sostanze che comunemente entrano in contatto con le piante. Inoltre si ritiene che la produzione di elicitori possa essere dovuta anche a microrganismi presenti negli organi digestivi degli insetti (Mitöfer *et al.*, 2005; Spiteller *et al.*, 2000) responsabili delle secrezioni orali. Sono stati identificati nelle secrezioni orali di larve di lepidotteri due classi di elicitori capaci di attivare entrambi la difesa indiretta delle piante; nella prima classe sono inclusi enzimi come una β -glucosidasi, isolata da *Pieris brassicae*, e una glucosio-ossidasi, isolata da *Helicoverpa zea*. Il primo enzima induce la biosintesi di terpeni (Mattiacci *et al.*, 1994; Mattiacci *et al.*, 1995), sostanze volatili presenti in numerose miscele di VOC vegetali, in foglie di cavolo e l'altro enzima neutralizza la produzione di nicotina, un alcaloide tossico per gli insetti in tabacco (Felton and Eichenseer, 1999). Alla prima classe inoltre appartengono enzimi riscontrati in insetti succhiatori come la fosfatasi alcalina isolata da *Bemisia tabaci* (Funk, 2001) e diversi enzimi digestivi presenti nella saliva degli afidi (Miles, 1999). Alla seconda classe di elicitori appartengono i *Fatty Amino Acid Conjugates* (FACs), acidi grassi coniugati ad amminoacidi che sono stati ritrovati nel rigurgito di larve di lepidotteri sfingidi (Halitschke *et al.*, 2001), nottuidi e geometrici (Alborn *et al.*, 1997; Pohnert *et al.*, 1999) e nel liquido di ovideposizione di un coleottero bruchide (Doss *et al.*, 2000). A questa classe di composti appartiene anche la volicitina che induce in plantule di mais ferite la produzione di terpenoidi volatili (Frey *et al.*, 2000; Truitt *et al.*, 2004). I passaggi iniziali della risposta della pianta agli elicitori delle difese contro insetti non sono stati ancora delucidati dal punto di vista molecolare, e fino ad adesso non sono ancora stati trovati recettori in pianta capaci di legare questi elicitori specifici per gli erbivori come lo sono ad esempio alcuni prodotti dei geni R per la risposta ad elicitori patogeni. E' però ampiamente descritto in letteratura che gli insetti fitofagi alimentandosi di tessuti vegetali procurano ferite alla pianta che risponde con una serie di segnali che, generati dal sito danneggiato, si propagano sistemicamente attraverso i vasi vascolari. Fra i diversi segnali attivati in seguito a ferite causate da insetti si annoverano: l'acido jasmonico, i polimeri di acido galatturonico, il perossido di idrogeno e la sistemina. Quest'ultimo scoperto in pomodoro nel 1991 (Pearce *et al.*, 1991), a differenza dei composti sopraccitati, è stato il primo peptide segnale identificato in pianta con funzioni di regolatore genico e di trasduttore del segnale cellulare. Da allora numerosi studi sono stati effettuati per approfondire il ruolo di questo peptide che desta ancora molto interesse, per la sua capacità di influenzare diversi *pathway* biosintetici e di regolare l'espressione di geni coinvolti nei meccanismi difensivi (Ryan, 2000).

3.3. Strategie di difesa in pomodoro

Il pomodoro è una specie modello importante anche per lo studio delle interazioni tra piante ed insetti dannosi e particolarmente interessante risulta per studiare la possibilità di incrementare entrambe le due tipologie di difesa, diretta ed indiretta, mediante un singolo gene che è la prosistemina, un gene endogeno del pomodoro capace infatti di incrementare entrambi i meccanismi difensivi.

3.3.1- La sistemina

In pomodoro in seguito all'attacco di insetti fitofagi dal taglio proteolitico della regione C-terminale della prosistemina di un polipeptide di 200 amminoacidi chiamato prosistemina, si origina la sistemina, un oligopeptide ormonale (Pearce *et al.* 1991; McGurl *et al.* 1992; McGurl e Ryan 1992). La sistemina di pomodoro è un peptide di 18 amminoacidi ricco di prolina che si accumula nella pianta in risposta a ferita e a danni meccanici sia nei siti direttamente feriti che in maniera sistemica nel resto della pianta dove è responsabile della produzione di proteine di difesa.

La sistemina è stato il primo peptide ormonale identificato (Pearce *et al.* 1991) e per molto tempo si è ritenuto che fosse l'unico peptide avente un ruolo nella traduzione del segnale in seguito a ferita (Ryan, 2000). Il rilascio della sistemina dal processamento del suo precursore, comporta l'attivazione di polifenolo ossidasi (PO) e inibitori di proteasi (PI), geni chiave della difesa delle piante. I Primi studi infatti mostrarono che la sistemina induce la sintesi degli inibitori di proteasi in foglie giovani di pomodoro quando viene somministrata loro attraverso il taglio del fusto ed a concentrazioni nano molar per pochi minuti (Pearce *et al.* 1991).

La sistemina è presente in 4 specie di Solanaceae quali *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Capsicum annum* e *Solanum nigrum* (fig.1). Il tabacco, un altro membro della famiglia delle Solanaceae, non esprime un gene omologo a quello di pomodoro, ma presenta ugualmente un'efficiente sistema di risposta a ferita (Pearce *et al.* 1993) e di trasferimento del segnale dalle foglie alle radici (Zhang e Baldwin, 1997), infatti il tabacco non ha un peptide con sequenza simile, ma peptidi di sequenza diversa ma con funzione ed attivazione analoga (Pearce *et al.*, 2001). Questo implica che peptidi diversi hanno funzioni simili in specie diverse

<i>Solanum lycopersicum</i>	..KIIVREDL <u>AVQSKPPSKRDPPKMQTD</u> ...
<i>Solanum tuberosum</i>	..KIVIRADL <u>AVHSTPPSKRDPPKMQTD</u> ...
<i>Solanum nigrum</i>	..KIIVKVDL <u>AVRSTPPPKRDPPKMQTD</u> ...
<i>Capsicum annum</i>	..KVVIRVDL <u>AVHSTPPSKRPPPKMQTD</u> ...

Fig. 1 : Allineamento delle sequenze amminoacidiche della regione della prosistemina in 4 specie di Solanaceae. Gli amminoacidi sottolineati sono quelli relativi alla sistemina e le sequenze contrassegnate da un asterisco in alto indicano gli amminoacidi conservati nel peptide sistemina

In pomodoro il precursore della sistemina è un polipeptide di 200 amminoacidi codificato da un gene di 4176 bp comprendente 11 esoni (fig. 2) di cui soltanto l'ultimo codifica per la sistemina, indicato con il numero 6 nella fig. 2.

La restante parte della sequenza, però, contiene cinque copie imperfette del peptide segnale (McGurl *et al.*, 1992). Sebbene in letteratura è riportato che solo la sistemina è responsabile dell'attivazione di risposte di difesa, non è esclusa la possibilità che le sequenze imperfette ripetute, quando processate, possano avere un ruolo nella trasduzione del segnale (Domborowski *et al.*, 1999).

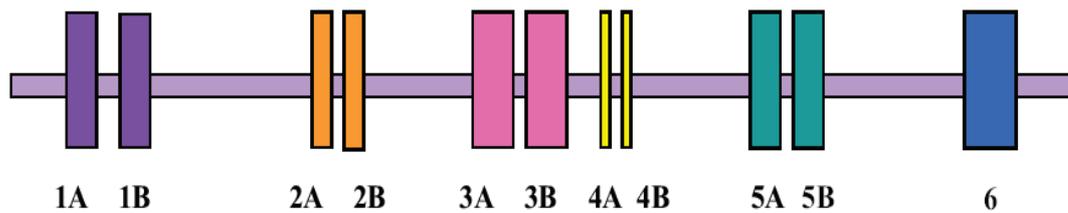


Fig. 2 - Struttura del gene della prosistemina in pomodoro.

Rappresentazione grafica della struttura del gene della prosistemina. Gli esoni sono indicati dai rettangoli

Il ruolo centrale nella traduzione del segnale in seguito a ferite di insetti fitofagi, è stato accertato grazie alla realizzazione di piante transgeniche esprimenti un costrutto antisense per questo peptide (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993). Le piante di pomodoro infatti deficitavano della capacità di segnalare a lunga distanza lo stato di ferita e la conseguente attivazione dei geni di difesa, che si esprimeva in una maggiore suscettibilità delle piante trasformate in seguito all'attacco di fitofagi rispetto alle piante non trasformate (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993). Esperimenti con il peptide marcato radioattivamente ne hanno evidenziato la localizzazione floematica ed una velocità di movimento elevata (Pearce *et al.* 1991). Anche se l'assenza di sequenze di segnali all'N terminale e di glicosilazione la differenziano dagli ormoni animali, tuttavia per le sue caratteristiche di movimento e di azione a basse concentrazioni, la sistemina è considerata il primo ormone identificato nel regno vegetale (Pearce *et al.*, 2001)

3.3.1.1 Meccanismi di azione della sistemina

La prosistemina è espressa costitutivamente a basso livello, manca di un peptide segnale o di altre sequenze di compartimentalizzazione, ed è quindi probabilmente una proteina citosolica (Ryan and Pearce, 1998). Tecniche di immunolocalizzazione hanno evidenziato che la prosistemina è presente nelle cellule parenchimali di vari organi e dei fasci vascolari, compartimentalizzata nel citosol e nel nucleo (Narvaez-Vasquez and Ryan, 2004). Le modalità di processamento del precursore e gli enzimi coinvolti non sono noti, ma da esperimenti con piante di tabacco esprimenti la prosistemina di pomodoro, a cui però è stata sostituita la parte codificante per la sistemina con il peptide TMOF, è stato rilevato che il TMOF viene liberato e conservato nel citosol delle cellule transgeniche, da cui si può dedurre che il processamento del precursore avviene con un meccanismo che si conserva all'interno dello stesso genere (Tortiglione *et al.*, 2003). Per lungo tempo la sistemina è stata considerata l'unico peptide avente un ruolo nella trasduzione del segnale in seguito a ferita (Ryan, 2000). In realtà, recentemente, in pomodoro sono stati individuati tre nuovi glicopeptidi ricchi di idrossiprolina di 20, 18 e 15 amminoacidi, chiamati rispettivamente TomHypSys I, II, and III che sembrano attivare strategie di difesa, simili alla sistemina in risposta al *wounding* ed alla fitofagia (Pearce G. and Ryan C.A. 2003). Per spiegare la liberazione del peptide in seguito al *wounding* sono stati formulati diversi modelli, uno di questi prevede il riversamento nel citoplasma di enzimi proteolitici, derivanti forse dalla rottura di organelli come il vacuolo o direttamente dalla saliva degli insetti, che tagliano la prosistemina. Un'altra teoria prevede la produzione della prosistemina ed il successivo processamento in modo costitutivo, e la sistemina così prodotta viene sequestrata e rilasciata in seguito al

wounding come è stato dedotto dallo studio di piante transgeniche che sovraesprimono costitutivamente la prosistemina (McGurl *et al.* 1994). Tali piante mostrano livelli alti di sistemina citosolica indicando che la produzione di quantità superiori del precursore si associa ad una maggior quantità di sistemina che può svolgere la sua azione essendo in eccesso. Un'altra teoria ipotizza la presenza della prosistemina e dell'enzima proteolitico responsabile dell'attivazione in citoplasmi di cellule differenti che vengono in contatto in seguito al *wounding* (Mc Gurl *et al.*, 1994). Il ruolo chiave del peptide sistemina nella difesa contro insetti erbivori in seguito a ferite, quali quelle provocate da insetti fitofagi, è stato accertato da esperimenti con piante transgeniche esprimenti un costrutto antisenso per questo peptide (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993). Questi esperimenti hanno mostrato che le piante antisenso di pomodoro deficitavano della capacità di segnalare a lunga distanza lo stato di ferita e la conseguente attivazione dei geni di difesa. Infatti per la seria compromissione della risposta al *wounding*, su queste piante modificate prese come modello larve del lepidottero *Manduca sexta* hanno avuto un tasso di crescita 3 volte superiore rispetto al controllo non trasformato. Ma la sovraespressione costitutiva della sistemina in pianta comporta sintesi di alti livelli di proteine indotte in risposta al danno (Mc Gurl *et al.*, 1994), dimostrando che la sistemina è uno dei segnali attivati dal danno meccanico. Mentre il ruolo biologico del precursore non è stato completamente chiarito molto si sa sul peptide sistemina. La produzione di sistemina è indotta localmente e sistemicamente dall'attacco di insetti masticatori e dal danno meccanico (effetto *chewing*). La sistemicità della sistemina è stata confermata mediante innesto di una pianta non trasformata (parte aerea) su una pianta trasformata (parte radicale) sovraesprimente la prosistemina (Mc Gurl *et al.*, 1994).

3.3.1.2 Il recettore della sistemina

La traduzione del segnale (risposta locale e sistemica) comporta rilascio del peptide sistemina che in concentrazioni estremamente basse innesca una cascata di eventi per cui alla fine la pianta attiva quali arsenali di difesa diretta numerosi geni appartenenti a 3 differenti categorie:

proteine antinutrizionali, componenti della via di trasduzione del segnale che determinano la produzione di acido jasmonico; proteinasi.

Il primo evento è l'attivazione del recettore di membrana SR160 (fig.3) che lega la sistemina ed attiva, tramite la via delle proteine chinasiche MAPK, e l'innalzamento del PH del mezzo extracellulare, una fosfolipasi di membrana (Ryan and Pearce, 2003). Questo enzima rilascia l'acido linoleico che è il substrato di partenza della via biosintetica degli octodecanoidi, che porta alla produzione di acido jasmonico indispensabile per la risposta agli insetti dannosi, in quanto responsabile dell'attivazione dei geni utili contro gli insetti come le polifenolo ossidasi e gli inibitori di proteasi (Heil *et al.*, 2008). Da esperimenti condotti con innesti di genotipi selvatici e mutanti di pomodoro è stato dimostrato che l'acido jasmonico è indispensabile per la risposta di difesa contro insetti dannosi. Infatti l'assenza di risposta alla sistemina da parte dei mutanti *jai-1*, incapaci di percepire acido jasmonico, innestati sul genotipo selvatico ferito dimostra che la percezione di questo composto è indispensabile per la trasmissione del segnale nelle foglie distali all'attacco (Li *et al.* , 2002). Da questi esperimenti è scaturita l'ipotesi che in pomodoro il peptide segnale sistemina promuove risposte in zone distali con l'amplificazione della produzione di JA nei tessuti dei vasi vascolari (Schilmiller and Howe, 2005) e che questo segnale

diventi sistemico nella pianta (Li *et al.* , 2002). Questa tesi è convalidata anche dalle capacità dell'acido jasmonico di indurre la produzione di enzimi proteolitici ipoteticamente coinvolti nel processamento della prosistemina (Bergey *et al.* ,1999). Il ruolo della sistemina nei meccanismi di difesa diretta è molto ben documentato in letteratura. Da precedenti studi è stato infatti dimostrato che, in pomodoro, la risposta a ferita è dipendente dalla sintesi di sistemina. Infatti, essa è processata dal suo precursore inattivo prosistemina e trasportata ai tessuti non feriti (Ryan,2000), dove è responsabile dell'attivazione di diversi geni coinvolti nella difesa diretta come gli inibitori di proteasi (McGurl *et al.*, 1994). Studi più recenti hanno dimostrato che il gene della prosistemina attiva in pomodoro l'espressione di geni coinvolti anche nella difesa indiretta oltre che diretta aumentando con la produzione di composti volatili l'attrattività nei confronti dei nemici naturali degli insetti fitofagi (Corrado *et al.*, 2007).

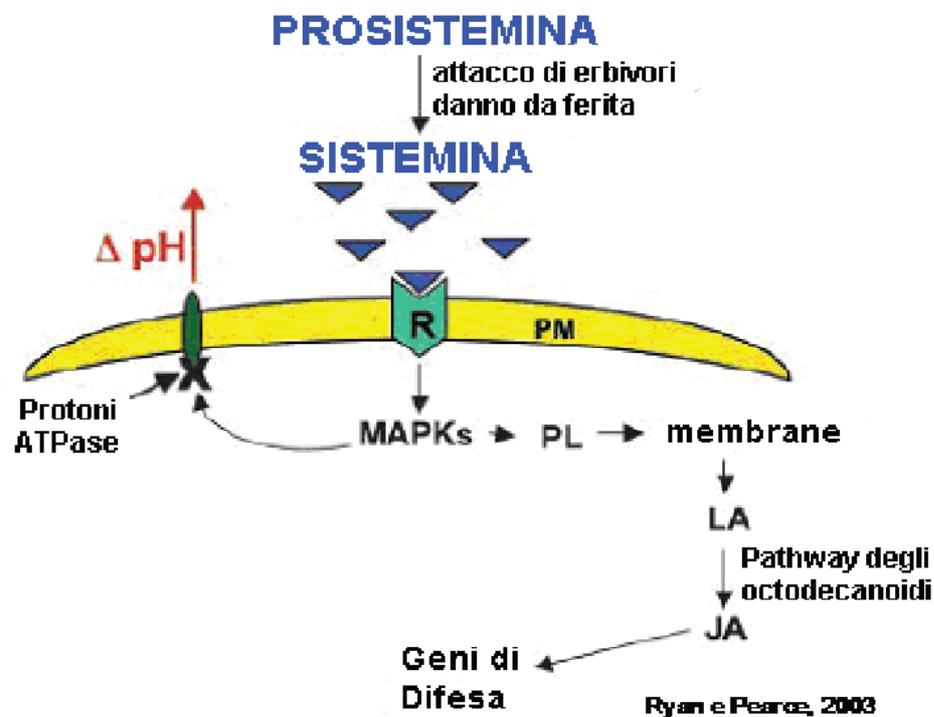


Fig. 3.- Diagramma del pathway di traduzione del segnale della sistemina.

Sono mostrati i punti salienti della traduzione del segnale, in particolar modo i passaggi che portano al blocco della ATPasi di membrana con la conseguente alcalinizzazione del mezzo extracellulare, e quelli che portano all'attivazione dei geni difensivi. PM: Membrana Plasmatica, PL: Fosfolipasi, LA: Acido Linoleico, JA: Acido Jasmonico (Ryan and Pearce, 2003).

3.4 Il gene Mi e la resistenza agli afidi in pomodoro

Nel tentativo di reperire fonti di variabilità genetica come possibile alternativa alla lotta chimica contro nematodi galligeni, negli anni '70 nel pomodoro è stato trovato un gene endogeno di resistenza, il gene Mi. Il meccanismo di resistenza del gene Mi ai nematodi galligeni si basa sull'inibizione degli enzimi catalasi ed ascorbico perossidasi coinvolti nello smaltimento del perossido di idrogeno. La forte inibizione di questi enzimi, rilevata 24 ore dopo l'attacco del nematode, determina nei tessuti attaccati un aumento del potenziale ossidativo e la presenza di molecole altamente tossiche, che da un lato hanno capacità nematocida e dall'altro conducono alla necrosi del tessuto coinvolto bloccando lo sviluppo del nematode (Mariotti, 2007). Studi effettuati dimostrano che il gene Mi nel pomodoro esplica un meccanismo di difesa riducendo alimentazione, fecondità e sopravvivenza degli afidi (Hebert *et al.*, 2007). E' stato dimostrato attraverso esperimenti di clonaggio del gene e trasformazione di piante suscettibili di pomodoro che la overespressione del gene endogeno Mi oltre alla resistenza ai nematodi conferisce anche la resistenza agli afidi, ed è questo il primo esempio di gene di resistenza in pianta attivo contro due organismi lontani filogeneticamente (Rossi *et al.*, 1998). E' stato osservato che il gene Mi determina resistenza a nematodi durante tutti gli stadi fenologici della pianta, ma la resistenza agli afidi solo durante la fioritura, cioè solo in fase riproduttiva e non anche allo stadio giovanile, e che la sovraespressione costitutiva di questo gene in piante transgeniche non ne anticipa la resistenza agli afidi, né ne aumenta il livello di resistenza osservato in fase di fioritura (Goggin *et al.*, 2004). Inoltre piante di melanzana (*S.melongena*) sono state trasformate con il gene Mi endogeno del pomodoro, per verificare il livello di resistenza indotta in una solanacea diversa dal pomodoro, per la difesa sia contro nematodi che afidi, e si è visto che in melanzana conferisce resistenza solo a nematodi e non anche agli afidi come in pomodoro. La resistenza agli afidi in melanzana richiede ulteriori geni che non sono conservati tra pomodoro e melanzana (Goggin *et al.*, 2006).

3.5 Scopi della ricerca

Questo progetto di dottorato ha avuto come obiettivo l'applicazione delle biotecnologie vegetali per lo studio di geni di resistenza diretta ed indiretta contro gli insetti dannosi nel pomodoro, ed il primo peculiare scopo di questa ricerca è stato quello di studiare la possibilità di incrementare entrambe le due tipologie di difesa mediante la sovraespressione in piante transgeniche di pomodoro scelte come modello di studio, di un singolo gene, la prosistemina. Inoltre è stata valutata la capacità della prosistemina di indurre meccanismi difensivi contro funghi fitopatogeni. Ulteriore scopo di questa ricerca è stato inoltre, quello di capire se il gene della Prosistemina (*Prosyst*) aumenta la resistenza agli afidi.

Per verificare la partecipazione della sistemina oltre che in risposte di difesa di tipo diretto, anche all'innesco di strategie difensive contro afidi, abbiamo scelto come sistema modello per la nostra analisi piante transgeniche già disponibili presso in nostro laboratorio, di *Solanum lycopersicum* cv "Better Boy" (BB) che sovraesprimono costitutivamente il cDNA della prosistemina sotto l'azione del promotore 35S del CaMV (piante siglate BBS), e che includono nel proprio background anche il gene Mi di resistenza agli afidi (Rossi *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1994) e quindi piante (Sys+Sys+ MiMi), ed il corrispondente controllo (piante

siglate BB) non trasformato della stessa cv e che non include il gene Mi (Sys-Sys-mimi). Le piante BBS sono state trasformate con una cassetta di espressione contenente il marcatore selettivo per la Kanamicina npt II ed il cDNA della prosistemina, preceduto da un promotore costitutivo forte, 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) (McGurl *et al.* 1994). Le piante BBS sovraesprimendo la sistemina mimano l'attacco dei fitofagi ed attivano meccanismi di difesa come un incremento della quantità di inibitori di proteasi (PI). E' stato infatti dimostrato che le piante trasformate producono gli stessi livelli di inibitori di proteasi di piante sottoposte a wounding (McGurl *et al.* 1994). Perciò le piante BBS sono un eccellente modello per analizzare la capacità della sistemina di innescare strategie di difesa contro insetti fitofagi. Con la realizzazione di incroci, finalizzati allo studio della combinazione di più geni di resistenza, si è voluto introgredire il gene *Prosys* nella cv BB unitamente al gene Mi di resistenza agli afidi, e analogamente nella cv RG (Sys-Sys-mimi), cioè che come BB non sovraesprime la sistemina e non include il gene Mi nel proprio background. Quindi ulteriore scopo della ricerca è stata la valutazione della presenza contemporanea dei due geni come interessante approccio per la difesa del pomodoro dagli afidi. Per il raggiungimento di questi obiettivi, l'attività di ricerca è stata articolata nelle seguenti fasi:

- Incroci tra linee transgeniche già esistenti per l'ottenimento di linee di pomodoro Mi che sovraesprimono il gene della Prosistemina (*Prosys*), previa analisi fenotipica e citologica dei parentali da incrociare;
- Selezione dei genotipi ottenuti dagli incroci mediante PCR per verificare l'avvenuta introgressione del gene della prosistemina, e analisi CAPS per verificare la presenza del gene *Mi*
- Backcross con i rispettivi parentali delle piante ottenute da incrocio risultate positive alle analisi molecolari

Preliminarmente agli incroci è stata effettuata una valutazione dei livelli di ploidia su base fenotipica prima e citologica dei parentali da incrociare.

I genotipi delle piante parentali BB e BBS sono stati quindi caratterizzati dal punto di vista morfologico, poiché la morfologia osservata suggeriva la possibile presenza di individui poliploidi. Infatti differenze morfologiche sono emerse tra piante BBS fortemente indicative della presenza di genotipi poliploidi tra queste piante rigenerate *in vitro*. Il livello di ploidia superiore al diploide, infatti, può essere indotto durante la fase di rigenerazione *in vitro* con frequenza variabile in relazione al genotipo, all'espianto e al contenuto ormonale (in particolare auxinico) del substrato. L'individuazione di piante transgeniche poliploidi è importante ai fini del trasferimento genico via incrocio, in quanto la poliploidia può comportare sterilità. I parentali, piante della cv "Better Boy" (BB) che sovraesprimono costitutivamente la sistemina sono stati quindi caratterizzati dal punto di vista morfologico per l'individuazione di piante con fenotipo poliploide da scartare come parentali, il che si verifica perché piante che derivano dalla coltura *in vitro*. L'analisi citologica effettuata su un campione di piante ritenute poliploidi su base fenotipica. Siccome però il materiale preesistente (piante BBS) utilizzato negli incroci, in realtà è costituito solo da poche linee transgeniche, il programma dell'attività di ricerca è stato articolato in fasi successive anche in esperimenti di trasformazione genetica del pomodoro con il gene *Prosys*, miranti ad ottenere una popolazione di piante trasformate, per poter verificare l'effettivo coinvolgimento della Sistemina nell'induzione di geni di resistenza diretta ed indiretta contro gli insetti dannosi nel pomodoro, nonché contro patogeni fungini. Gli esperimenti di trasformazione genetica con il gene della prosistemina per

l'espressione costitutiva del relativo prodotto genico, indi sono stati seguiti da caratterizzazione molecolare dei rigeneranti ottenuti per lo screening di piante trasformate da poter utilizzare unitamente alle linee isogeniche di pomodoro ottenute mediante incrocio e successiva selezione mediante PCR ed analisi CAPS, come sistema modello in saggi biologici contro afidi e patogeni fungini.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Plasmide utilizzato

Per gli esperimenti di trasformazione genetica del pomodoro finalizzati all'espressione costitutiva del gene della prosistemina (Prosyst), via *Agrobacterium tumefaciens*, è stato utilizzato il plasmide pMZ, già disponibile in laboratorio. Il plasmide pMZ deriva da un vettore binario che all'interno della sequenza del T-DNA, oltre al gene selezionatore di resistenza a Kanamicina, contiene una cassetta di espressione in cui, utilizzando gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, è stata inserita una sequenza di cDNA codificante per gli esoni 10 ed 11 della prosistemina, sotto l'azione del promotore costitutivo CaMV 35S e del terminatore RbcS (McGurl *et al.*, 1994).

4.2 Trasformazione di E. coli

Per la trasformazione del DNA, il plasmide pMZ è stato inserito in cellule competenti di *E. coli* ceppo DH5 α , mediante elettroporazione. La tecnica consiste nell'aggiungere a 50 μ l di cellule elettrocompetenti, 10-20 ng di plasmide ricombinante in cuvette per elettroporazione (Bio-rad) e nell'applicazione di una differenza di potenziale di 1800 V per 4 ms utilizzando l' "*E. coli pulser*" (Bio-rad), cui segue l'immediata aggiunta alla miscela di 800 μ l di LB. La sospensione cellulare viene poi incubata a 37°C per 45 min in agitazione a 200 rpm. Poi vengono piastrate aliquote di 100 μ l e 200 μ l della sospensione batterica in capsule petri contenenti il substrato LB solido con gli opportuni antibiotici selettivi. Le piastre vengono poi incubate a 37°C per 16 ore in modo da ottenere una concentrazione di cellule batteriche sufficiente per la successiva estrazione di DNA plasmidico.

4.2.1 Estrazione e digestione del DNA plasmidico estratto da E. coli

L'estrazione del DNA plasmidico (Birnboim and Doly, 1979) è stata effettuata tramite un protocollo di lisi alcalina che prevede le seguenti fasi. Ogni singola colonia di *Escherichia coli* contenente il plasmide ricombinante è stata inoculata in 3 ml di mezzo di coltura LB (Luria-Bertani) in presenza degli antibiotici selettivi e fatta crescere a 37°C in agitazione a 200 rpm per 16 h. Dopo tale periodo, 1,5 ml di coltura batterica sono stati centrifugati a 14000 rpm per 30 secondi. Successivamente, il pellet ottenuto è stato risospeso in 100 μ l di Soluzione I (50 mM glucosio, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), agitando vigorosamente. Quindi, dopo un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio, sono stati aggiunti 200 μ l di Soluzione II (0,2 M NaOH, 1% SDS), e i campioni sono stati miscelati mediante inversione dei tubi. Dopo un'ulteriore incubazione per 5 minuti in ghiaccio sono stati aggiunti 150 μ l di Sol III (60% 5 M Acetato di Potassio, 11,5% acido acetico). I campioni sono stati miscelati mediante inversione dei tubi, indi centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato trasferito in nuovi tubi dove sono stati aggiunti 0,1 volumi di 3 M Acetato di Sodio (pH 7,0) e di 2 volumi di etanolo al 96%. I campioni sono stati incubati a -80°C per 5 minuti e poi centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti (4°C). Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet ottenuto è stato prima lavato con etanolo al 70%, recuperato dopo centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C e risospeso in TE (pH 8.0). Per verificare la presenza del DNA esogeno nel vettore plasmidico pMZ, il DNA plasmidico estratto è stato quindi

sottoposto a digestione con gli opportuni enzimi di restrizione per ottenere il rilascio dell'inserto come controllo. La reazione di digestione è stata allestita utilizzando gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII in grado di tagliare sul plasmide pMZ i lati del sito di clonaggio contenenti la sequenza di cDNA codificante per gli esoni 10 ed 11 della prosistemina, sotto l'azione del promotore costitutivo CaMV 35S e del terminatore RbcS. Le colonie risultate positive allo screening con gli enzimi di restrizione, sono state poi utilizzate per la realizzazione di "frozen" mediante l'aggiunta di 400 µl di glicerolo sterile a 400 µl di coltura batterica, conservati in un freezer a -80°C.

4.3 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens* con il plasmide pMZ

4.3.1 Preparazione del plasmide pMZ

Il plasmide pMZ che contiene una cassetta di espressione in cui, utilizzando gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, è stata inserita una sequenza di cDNA codificante per gli esoni 10 ed 11 della prosistemina, sotto l'azione del promotore costitutivo CaMV 35S e del terminatore RbcS, è stato inserito per elettroporazione in cellule di *E. coli*. Da 2 colonie trasformate di *E. coli*, è stato estratto il DNA plasmidico dei rispettivi 2 plasmidi pMZA e pMZB. Dopo quantificazione mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% per confronto visivo con quantità note di DNA genomico del fago λ (Promega), il DNA plasmidico di entrambe le colonie è stato sottoposto a digestione con gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, per controllare se in seguito a digestione con tali enzimi viene rilasciato l'inserto di 650 bp corrispondente al cDNA della prosistemina. I prodotti della digestione sono stati in seguito sottoposti ad elettroforesi e per entrambi i plasmidi la digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, ha determinato il rilascio del frammento di dimensioni attese. Il DNA ottenuto dopo digestione è stato sottoposto ad elettroforesi e quantificato per confronto visivo con quantità note di DNA genomico del fago λ (Promega). Il DNA plasmidico così estratto è stato utilizzato per la trasformazione di cellule competenti di agrobatterio per gli esperimenti di trasformazione genetica del pomodoro. Per gli esperimenti di trasformazione genetica del pomodoro con il gene della prosistemina, relativamente alla cv Red Setter è stato impiegato il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens*, mentre per la cv Rio Grande oltre al ceppo LBA4404 è stato utilizzato anche il ceppo EHA105. Per la preparazione delle cellule di *Agrobacterium tumefaciens* da sottoporre a trasformazione con il plasmide pMZ, si è proceduto con l'inoculo di una singola colonia in 3 ml di LB contenente 1 mg/l di rifampicina e successiva incubazione a 28°C a 160 rpm per 16 ore, in seguito si procede all'inoculo di 5 ml della precoltura batterica in 50 ml di LB contenente 1 mg/l di rifampicina e all'incubazione a 28°C in agitazione a 160 rpm fino al raggiungimento di un'assorbanza di 0,3. Allora la coltura viene fatta raffreddare in ghiaccio per 15 min e poi si centrifuga la sospensione cellulare a 3000 rpm per 5 min a 4°C ed il supernatante viene scartato. Le cellule si risospendono in 10 ml di una soluzione fredda di MgCl₂ 100 mM autoclavata, si collocano in ghiaccio per 1 ora e si centrifugano per 5 min a 3000 rpm. Il supernatante si elimina e le cellule si risospendono in 2 ml di una soluzione fredda di 20 mM CaCl₂ e poi lasciate in incubazione in ghiaccio per 6 ore. Le cellule possono essere conservate per lunghi periodi a -80°C aggiungendo alla soluzione glicerolo fino al 20%. Le cellule di Agrobatterio così preparate possono essere utilizzate per la trasformazione. L'inserimento del DNA all'interno dei ceppi LBA4404 ed EHA105 di *Agrobacterium tumefaciens*, utilizzati per gli esperimenti di trasformazione del pomodoro con il

plasmide pMZ, è stato ottenuto mediante l'aggiunta di 1 mg di DNA plasmidico allo stock di glicerolo dopo scongelamento, miscelando delicatamente la soluzione. Dopo congelamento in azoto liquido per 10 min ed incubazione a 37°C per 5 min, 10 µl della soluzione contenente le cellule di Agrobatterio LBA4404 sottoposte a trasformazione con il plasmide pMZ, sono stati piastrati su LB solido con 1 mg/ml di rifampicina ed opportuni antibiotici selettivi del plasmide inserito. Dalle cellule di Agrobatterio trasformate è stato estratto il DNA plasmidico ed è stata ripetuta la digestione con gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, come descritto al paragrafo 4.2.1.

4.4 Trasformazione genetica della cv di pomodoro "Rio Grande", con il gene della prosistemia mediante *Agrobacterium tumefaciens*

4.4.1 Materiale vegetale

In via preliminare per i primi esperimenti di trasformazione genetica via *A. tumefaciens* è stata scelta la cv Rio Grande (RG) in quanto di buona e comprovata capacità rigenerativa a partire da espianto cotiledonare (Caccia *et al.*, 1998; Schettino *et al.*, 1998). Gli esperimenti di rigenerazione e trasformazione della cv Rio Grande (RG) di pomodoro con il gene *Prosys*, hanno previsto il peculiare utilizzo di espianti fogliari oltre che cotiledonari (Mc Cormick *et al.*, 1986; van Roekel *et al.*, 1993; Koornneef *et al.*, 1989). I semi della cv Riogrande (RG) sono stati sterilizzati in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2%, per 20 minuti, sotto cappa a flusso laminare e in agitazione, in seguito sono stati accuratamente sciacquati in acqua sterile per tre volte e successivamente posti a germinare in contenitori Magenta (Duchefa) su terreno agarizzato A sterilizzato per 20' a 121 °C, a circa 3 mm di profondità. Il terreno A, composto da sali MS (Murashige e Skoog), contenente 3% di saccarosio, 0,6 % di agar, pH 5,8 (Tab. 1), è stato sterilizzato in autoclave per 20' a 121° C e dispensato nelle Magenta in condizioni di sterilità. Le Magenta con i semi sono state collocate in camera di crescita a 25 ±1 °C, 16 h luce / 8 h buio. In queste condizioni da essi si sono sviluppate *in vitro* le plantule da utilizzare come materiale vegetale per la trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens* al fine di ottenerne piante transgeniche per il gene *Prosys*.

4.4.2 Preparazione dell'inoculo batterico di *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ed LBA4404

Per la trasformazione della cv Rio Grande, sono stati utilizzati due ceppi di *Agrobacterium tumefaciens*, contenenti il plasmide pMZ: il ceppo EHA105 ed il ceppo LBA4404 rispettivamente. L'inoculo è stato preparato facendo crescere ciascun ceppo di *A. tumefaciens*, contenente il plasmide pMZ, nel terreno liquido LB contenente 5 g/l di estratto di lievito, 10 g/l di triptone, 10 g/l di NaCl e pH 7,5, sterilizzato in autoclave per 20' a 121 °C (Tab.1). Gli antibiotici, 100 mg/l canamicina e 30 mg/l di rifampicina (Rif), sono stati aggiunti a detto substrato solo dopo la sua sterilizzazione in autoclave, durante il raffreddamento, quando la sua temperatura aveva raggiunto circa 30-35°C.

Tab. 1- Composizione del terreno LB

Componenti	Quantità
Estratto di lievito	5 g/l
Tryptone	10 g/l
NaCl	10 g/l
Canamicina*	100 mg/l
Rifampicina*	30 mg/l
pH	7,5

* Aggiunti al substrato dopo sterilizzazione in autoclave per 20' a 121°C

L'inoculo contenuto in tubi Falcon (50 ml), è stato quindi messo a sviluppare nel terreno liquido LB in incubatore a 28°C per 24-36 h a 200 rev/min, indi è stato poi centrifugato a 3500 rpm (rotazione per minuto). Il "pellet" batterico ottenuto dopo centrifugazione è stato risospeso in mezzo liquido LB senza antibiotici in tubi Falcon (50 ml) ad una concentrazione finale di 10^8 cellule/ml (O.D. 600 = 0,1-0,2).

4.4.3 Rigenerazione e trasformazione genetica con il gene della prosistemia (Prosys) della cv di pomodoro "Rio Grande", sia da espianti cotiledonari che Fogliari

Da plantule di 10 giorni delle cultivar RG cresciute sul substrato di coltura A in contenitori Magenta (Tab. 2), sono stati prelevati i cotiledoni e tagliati in 2 pezzi, dopo aver eliminato le porzioni apicale e basale, per la trasformazione da espianto cotiledonare. Per la trasformazione da espianto fogliare della cv RG, invece, sono stati prelevati non i cotiledoni ma le prime foglie vere, da plantule di 15-20 giorni. In entrambi i casi poi, sia negli esperimenti di trasformazione da espianti cotiledonari che in quelli da espianti fogliari, gli espianti, così preparati, sono stati posti con la pagina inferiore rivolta verso l'alto, in capsule Petri contenenti 25 ml del substrato di preconditionamento B e tenuti al buio in camera di crescita a $25\pm 1^\circ\text{C}$, 16 h luce / 8 h buio (Tab. 2). Dopo 48 h i cotiledoni preconditionati sono stati co-coltivati con l'inoculo di *A. tumefaciens* per 20' e poi rimessi sullo stesso terreno B al buio, sempre a $25\pm 1^\circ\text{C}$, 16 h luce/ 8 h buio. Dopo 24 h gli espianti sono stati trasferiti su mezzo di rigenerazione C (Tab. 2) e tenuti a luce soffusa in camera di crescita a $25\pm 1^\circ\text{C}$ con lo stesso fotoperiodo della fase di crescita. Dopo una settimana gli espianti sono stati messi su substrato di coltura D (Tab. 2). Gli espianti sono stati mantenuti a luce soffusa per una settimana per indurre la rigenerazione e poi trasferiti ogni 20 gg su terreno D fresco a $25\pm 1^\circ\text{C}$, 16 h luce/ 8 h buio. I germogli rigenerati dai calli sono stati prelevati, tagliandoli asetticamente, quando avevano raggiunto la lunghezza di 1-2 cm circa, e messi a radicare su terreno di coltura E (Tab. 2). La composizione dei diversi substrati di coltura (A, B, C, D, E) utilizzati nelle varie fasi della trasformazione *in vitro*, è riportata nella Tab. 2. Le poche piantine in grado di radicare sono state mantenute in camera di crescita e micropropagate ogni 20-30 giorni, al fine di disporre di 3-5 microtalee radicate per tipo. Alcuni individui di ciascun dei pochi cloni ottenuti sono stati trasferiti in terriccio e posti in serra al fine di osservare le loro caratteristiche morfologiche durante lo sviluppo, di riprodurli e raccoglierne i semi.

Tab. 2- Composizione dei terreni di coltura utilizzati nelle diverse fasi della procedura di trasformazione partendo da espianti cotiledonari. Le condizioni sono state 25±1°C, 16 h luce/ 8 h buio

Componenti	A	B	C*	D	E
MS**	1X	1X	1X	1X	1X
Saccarosio	3%	3%	3%	3%	3%
Agar (Duchefa)	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Zeatina (filtrata) mg/l		0.7	0.7	0.7	
IAA mg/l		0.35	0.35	0.35	0.35
IBA mg/l					0.1
2,4 D mg/l		0.1			
Cefotaxime mg/l			200		200
Vancomicina mg/l			50		
Carbencillina mg/l				500	
Canamicina mg/l				100	50

* Condizioni di luce soffusa durante la coltura

** Murashige and Skoog

Sono state utilizzate diverse varianti di questo protocollo di rigenerazione e trasformazione del pomodoro (Schettino *et al.*,1998), diversificato (tab. 3) per il contenuto auxinico e cioè rispettivamente per concentrazioni decrescenti di IAA di 0,35 mg/l (substrato A), 0,175mg/l (substratoB), 0,1 mg/l (substrato C); miranti all’ottenimento di un protocollo ottimale per la trasformazione della cv RG con il gene *Prosys*. Per l’inoculo sono stati utilizzati due ceppi di *A.tumefaciens*: LBA4404 ed EHA105. Inoltre sono stati effettuati anche esperimenti di trasformazione a partire da espianti fogliari (Mc Cormick S.*et al.*,1986; Jeroen S.C. van Roekel *et al.*,1993; Koornneef *et al.*,1989). Si è dunque cercato di individuare il substrato ottimale per la rigenerazione del pomodoro cv Rio Grande oltre che da espianto cotiledonare anche da espianto fogliare in 6 esperimenti di trasformazione (Tab. 3)

Tab.3- Esperimenti di trasformazione genetica di RG con gene *Prosys* da espianto fogliare e cotiledonare, su 3 diversi substrato e con 2 diversi di *A. tumefaciens* LBA4404 ed EHA105

Trasformazione genetica

Esp.	Ceppo <i>A. tumefaciens</i>	Espianto	Substrati			risultati
			A	B	C	
I	LBA4404	Cotiledoni	A	B	C	Callo iniziale
II	LBA4404	Cotiledoni		B	C	Callo iniziale
III	EHA105	Cotiledoni		B	C	Callo
IV	EHA105	Cotiledoni Foglia		B	C	Callo
V	EHA105	Foglia			C	Callo
VI	EHA105	Foglia			C	Callo e germogli

4.5 Trasformazione genetica della cv di pomodoro “Red Setter”, con il gene della prosisteminina mediante *Agrobacterium tumefaciens*

4.5.1 Materiale vegetale

Oltre agli esperimenti di trasformazione genetica via *A. tumefaciens* con la cv Rio Grande (RG) , ulteriori esperimenti di rigenerazione e trasformazione del pomodoro (quelli che hanno dato i migliori risultati) sono stati fatti utilizzando come cv elettiva la cv “Red Setter”. Per gli esperimenti di trasformazione con il gene *Prosys* della cv “Red Setter” sono stati utilizzati espianti cotiledonari. I semi della cv “Red Setter”. previa sterilizzazione con una soluzione di etanolo al 70% per 5-6 minuti, sono stati immersi in una soluzione con candeggina commerciale 10% ed SDS 0,1% per 10 min e poi sono stati accuratamente sciacquati in acqua sterile e successivamente posti a germinare su terreno di coltura TRI I (Tab.4), a distanza di circa 0,5 cm in camera di crescita a 25±1°C, e con fotoperiodo di 16 h luce/ 8 h buio. In queste condizioni da essi si sono sviluppate *in vitro* le plantule da utilizzare come materiale vegetale per la trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens* al fine di ottenerne piante transgeniche per il gene *Prosys*, con il prelievo di cotiledoni quando non sono ancora presenti foglie vere (dopo 7-8 giorni circa).

4.5.2 Preparazione dell'inoculo batterico di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Per la trasformazione della cv "Red Setter", è stato utilizzato il ceppo LBA4404 di *Agrobacterium tumefaciens*, contenente il plasmide pMZ. Dopo un preinoculo di una singola colonia di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983) in 10 ml del terreno di coltura AB con 500 mg/l di streptomina e 50 mg/l di Kanamicina lasciato in incubazione a 28°C per 16 ore in agitazione a 180 rpm; l'inoculo è stato preparato facendo crescere il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens*, contenente il plasmide pMZ, nel terreno AB con gli opportuni antibiotici e aggiunta di glucosio al 2%, in incubazione a 28°C per 16 ore in agitazione a 180 rpm. Indi è stato poi centrifugato a 4000 rpm per 10 min a T ambiente in tubi Falcon. Il "pellet" batterico ottenuto dopo centrifugazione è stato risospeso nel mezzo liquido AB senza antibiotici in tubi Falcon (50 ml) fino ad una assorbanza misurata a 600 nm allo spettrofotometro di 0,6.

4.5.3 Rigenerazione e trasformazione genetica con il gene della prosistemia (Prosys) della cv di pomodoro "Red Setter", da espianti cotiledonari

Da plantule di 7-8 giorni circa delle cultivar "Red Setter", cresciute sul substrato di coltura TRI I (Tab. 4), sono stati prelevati i cotiledoni con taglio trasversale in frammenti di circa 5 mm, per la trasformazione da espianto cotiledonare. Immediatamente dopo il taglio, 32 espianti da utilizzare come controllo, e che non vanno co-coltivati quindi con l'agrobatterio, sono stati immersi in AB liquido in capsule petri e poi posizionati su una piastra con GCF10 (Tab.4) ed un dischetto di carta Whatman. I restanti espianti cotiledonari, sono stati invece co-coltivati con il ceppo LBA4404 di Agrobatterio mediante immersione in capsule Petri contenenti la sospensione dell' Agrobatterio e lasciati in incubazione per 10 min. Quindi gli espianti sono stati trasferiti con la pagina superiore rivolta in basso sul substrato GCF10 contenente 375 µM acetosiringone e un disco di carta Whatman sterile. Gli espianti vengono poi lasciati per 2 giorni al buio a 26°C, e poi gli espianti co-coltivati con l'agrobatterio vengono trasferiti sempre con la pagina superiore rivolta in basso, su substrato GCF10 con 500 mg/l di carbencillina e 40 mg/l di Kanamicina (Tab. 4). Dei 32 espianti controllo che non sono stati co-coltivati con l'agrobatterio, invece, 16 espianti vengono trasferiti su GCF10, come controllo della rigenerazione, e gli altri 16 invece vengono trasferiti sul substrato GCF10 addizionato di 500 mg/l di carbencillina e 40 mg/l di Kanamicina (Tab.4) come controllo di selezione. Per due settimane consecutive tutti gli espianti vengono trasferiti su substrato di selezione fresco. Quando dopo tre settimane circa, si osserva inizio di callogenese degli espianti, questi primi calli formati vengono trasferiti su substrato GCF11 addizionato di 500 mg/l di carbencillina e 40 mg/l di Kanamicina (Tab.4). I primi germogli veri, rigenerati dai calli dopo circa 4 settimane, vengono prelevati, tagliandoli a setticamente, quando hanno raggiunto la lunghezza di 1-2 cm circa, e messi a radicare su terreno di coltura TRI2 (Tab.4) con 250 mg/l di carbencillina e 25 mg/l di Kanamicina (Tab.4) e ogni 20-30 giorni si effettua trasferimento su substrato fresco. La composizione dei diversi substrati di coltura (TRI1, GCF10, GCF11, TRI2) utilizzati nelle varie fasi della trasformazione *in vitro*, è riportata nella Tab. 4, le piantine che hanno formato un buon apparato radicale, vengono trasferite in *plateau* di polistirolo avvolti da una

pellicola trasparente per creare un microambiente con ridotto stress evapotraspirativo. Dopo circa di giorni di acclimatamento, le piantine vengono quindi trasferite dal *plateau* in vasi di terra ed allevate in camera di crescita.

Tab. 4- Composizione dei terreni di coltura utilizzati nelle diverse fasi della procedura di trasformazione della cv Red Setter da espianti cotiledonari. Le condizioni sono state 25±1°C, 16 h luce/ 8 h buio

Componenti	MS30	TRI 1	GCF10	GCF11	TRI 2
MS**	4,3 g/l	2,2 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	2,2 g/l
Tiamina mg/l	0,4	0,2	0,4	0,5	0,2
Myo-inositolo mg/l	100	50	100	100	50
Glicina mg/l				2	
Piridossina			0.5	0.5	
Acido folico mg/l				0.5	
Biotina mg/l				0.05	
Zeatina riboside mg/l			1,5	1,9	
NAA mg/l					0.1
IAA mg/l	0.2	0.2			
Ancymidol mg/l					0,5
Acido nicotinico mg/l			0,5	4,9	
Saccarosio g/l	30	15	30	30	15
Carbencillina mg/l			500	500	250
Kanamicina mg/l			50 ±10	50 ±10	25
Agar g/l	-	8	8	8	8
pH	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9

** Murashige e SKoog

4.5.3.1 Allevamento e propagazione dei trasformanti ottenuti dalla trasformazione della cv "Red Setter"

Le piantine vengono allevate in vivo in camera di crescita climatizzata a 24°C, con fotoperiodo di 16 h luce/ 8 h buio e luminosità di 5000 lux. Dopo circa 2 settimane vengono trasferite in vasi di 9 cm di diametro, con una miscela di terreno sterile e substrato di tipo S (Florigard). Al raggiungimento dell'attività riproduttiva, dalle bacche mature raccolte è stato estratto il seme, sottoposto a trattamento con HCl 3% per una notte, e poi conservato in camera climatizzata a 4°C.

Per l'ottenimento delle generazioni successive a partire dalla T₀, semi sono stati messi a germinare su dischetti di carta Whatman imbevuti di acqua sterile in capsule petri, e lasciati in camera di crescita al buio a 25°C per 5 giorni circa, e con l'emissione della radichetta e protusione dei cotiledoni, trasferiti in *plateau* di polistirolo e poi in vaso come descritto nel par. 4.5.3.

4.6 Screening delle piante trasformate della cv "Red Setter" mediante analisi Molecolari

Le piante ottenute dalla trasformazione della cv "Red Setter" con il gene della prosistemia, sono state sottoposte ad uno screening molecolare che ha previsto: estrazione di DNA genomico, quantificazione e selezione delle piante trasformate mediante amplificazione di una regione del promotore 35S².

4.6.1 Estrazione e quantificazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico dalle piante della progenie T₀, 2 dischi fogliari (50-100 mg) sono stati inseriti in un tubo eppendorf, sottoposte a rapido congelamento mediante immersione in azoto liquido e macinati con puntali per pipette. La polvere ottenuta è stata sospesa in 750 µl di Micropep buffer [2,5 parti di buffer di estrazione (0,35 M di Sorbitolo, 0,1 M Tris-base, 5mM EDTA, pH 7,5), 2,5 parti di buffer di lisi (0,2 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB), 1 parte di sarcosyl 5% p/v e 0,3 g di bisolfito di sodio] (Fulton *et al.*, 1995), e poi incubata a 65°C per 30-120 min e miscelata ogni 10 min. La sospensione è stata poi trattata con 750 µl di cloroformio/alcool isoalilico (24:1), miscelando bene delicatamente. Dopo centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C, la fase acquosa è stata prelevata e trasferita in nuovo tubo eppendorf aggiungendovi isopropanolo freddo (4°C), invertendo il tubo fin quando si osserva precipitazione di DNA. Dopo un'immediata centrifugazione per 5 min, il pellet è stato lavato con etanolo al 70%, ricentrifugato, asciugato ed infine risospeso in 50 µl di acqua bidistillata sterile e conservato a 4°C. Con successiva elettroforesi su gel di agarosio (Sambrook *et al.* 1989), il DNA estratto è stato quantizzato, stimandone la concentrazione per confronto visivo con concentrazioni note del DNA del fago λ.

4.6.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per discriminare gli effettivi trasformanti è stata amplificata una regione del promotore 35 S del CaMV presente nella cassetta di espressione contenuta nel plasmide pMZ, mediante PCR utilizzando i primer Pc35SpHannFW e Pc35SpHannRW, riportati in tab. 5.

Aliquote di 150 ng di DNA genomico estratto sono state sottoposte ad amplificazione mediante PCR. La reazione è avvenuta in 50 μ l contenenti 10 μ l GoTaq Buffer 5X (Promega), 0,4 μ l di dNTP 25 mM, 2,5 μ l di entrambi i primer 10 mM e 0,3 μ l GoTaq 5 U/ μ l (Promega). Il ciclo base di amplificazione (Tab. 5) ha una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 5 minuti e una fase di polimerizzazione finale a 72°C per 7 minuti. Successivamente i campioni sono stati sottoposti a separazione elettroforetica in gel d'agarosio all'1,2 % effettuata per circa 45 minuti applicando una differenza di potenziale di 5V/cm e le bande vengono quindi visualizzate mediante esposizione ai raggi UV.

Tab. 5: Elenco dei primer e delle loro condizioni di amplificazione

Primers	Sequenza (5' – 3')	Gene	N°accesione (Referenza)	T _m ¹	L.P.	L.A.	Ciclo	NR
PcEF Fw Rt	CTCCATTGGGTCGTTTTGCT	<i>EF1-α</i>	X53043 Shewmaker <i>et al.</i> , 1990	62	20	101	10 min a 95°C 30 sec a 94°C 15 sec a 51°C	40
PcEF Rv Rt	GGTCACCTTGGCACCAGTTG			64	20			
PC-BBSBB Fw	GGGAGGGTGCCTAGAAATA	<i>Proslys</i>	M84801.1 McGurl <i>et al.</i> , 1992	60	20	110 ² 717 ³	30 sec a 95°C 30 sec a 51°C 2 min a 72°C	30
PC-BBSBB Rv	TTGCATTTTGGGAGGATCAC			58	20			
Pc35SpHannFW	TGCTGACCCACAGATGGTTA	<i>35S²</i>	AJ311872.1 Wesley <i>et al.</i> , 2001	60	20	212	45 sec a 95°C 45 sec a 56°C 45 sec a 72°C	25
Pc35SpHannRW	GAAGCAGCCTTGAATCGTC			60	20			
Pc-LeEF Fw	AAGCTGCTGAGATGAACAAG	<i>EF1-α</i>	X14449.1 X53043.1 Shewmaker <i>et al.</i> , 1990	58	21	687 767	45 sec a 94°C 45 sec a 53°C 45 sec a 72°C	25
Pc-LeEF RW	GTCAAACCAGTAGGGCCAAA			54	21			
Mi REX Fw	TCGGAGCCTTGGTCTGAATT	<i>Mi</i>	AY949616 Williamson <i>et al.</i> , 1994	60	20	650	45 sec a 95°C 45 sec a 55°C 1min a 72°C	30
Mi REX RW	GCCAGAGATGATTCGTGAGA				20			

T_m: temperatura di melting; N.R.: = Numero di ripetizioni del ciclo; L.P.: Lunghezza primer; L.A.: Lunghezza amplificato

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Questa tecnica molecolare prevede l'isolamento dell'RNA e la sintesi del primo filamento di DNA complementare (cDNA) all'RNA messaggero e la successiva amplificazione di sequenze specifiche mediante PCR

4.7.1 Estrazione dell'RNA totale da foglia

Per isolare l'RNA totale da foglie dei trasformanti di pomodoro della cv "Red Setter", si è seguito un protocollo di estrazione che prevede la macerazione di 0,5 g di tessuto fogliare in azoto liquido, e successivo trasferimento in tubi eppendorf da 2 ml contenenti 750 µl di buffer di estrazione (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS) e 750 µl di fenolo/cloroformio 1:1 (v/v) e poi immediato miscelazione su vortex fino ad ottenere un'emulsione. Subito dopo i campioni vengono centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C e il surnatante ottenuto è stato trasferito in nuovi tubi contenenti 1 ml di fenolo/cloroformio (1:1) e miscelato su vortex. Dopo una nuova centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C, il surnatante viene trasferito in un nuovo tubo contenente 1 ml di fenolo/cloroformio (1:1), viene agitato e centrifugato nuovamente a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C. Successivamente, al surnatante vengono aggiunti 750 µl di isopropanolo e i campioni vengono lasciati in ghiaccio per 5 minuti. Dopo una centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C, viene eliminato il surnatante e il pellet viene risospeso in 400 µl di acqua DEPC 1%. Alla soluzione vengono poi aggiunti 400 µl di cloruro di litio 4M e viene poi lasciata in incubazione per una notte in ghiaccio. Successivamente viene centrifugata a 14000 rpm per 20 minuti a T ambiente, ed il pellet contenente l'RNA, risospeso in 400 µl di acqua DEPC. L'RNA viene indi precipitato tramite l'aggiunta di 40 µl di 3M Acetato di Sodio (pH 7,0) e 1 ml di etanolo 96%, e lasciato in incubazione per 10 minuti a -80°C. Dopo centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C e l'eliminazione del surnatante, il pellet viene risospeso in 42 µl di acqua bidistillata sterile.

4.7.2 Quantificazione dell'RNA

L'RNA è stato quantificato tramite analisi allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf). L'RNA viene diluito 100 volte in TE (pH 8,5) per misurare l'assorbanza a 260 nm. Per il calcolo della concentrazione dell'RNA è stato applicata la seguente formula:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Il controllo dell'integrità del RNA è stato eseguito tramite elettroforesi in gel di agarosio 1,2% in buffer TAE . Prima della corsa 5 µg di campione vengono incubati a 65°C per 5 minuti dopo l'aggiunta di 20 µl di 10 X Loading buffer RNA (400 µl formammide, 400 µl 37% formaldeide, 1,2 µl di 10 mg/ml di etidio bromuro, 5 µl Loading buffer 10 X; per la separazione elettroforetica delle bande dell'RNA è stata applicata una differenza di potenziale di 50 Volt per circa 60 minuti.

4.7.3 Sintesi del primo filamento di cDNA

Questa tecnica prevede il trattamento dell'RNA estratto con la DNasi I per eliminare eventuali contaminazioni residue di DNA genomico e la retrotrascrizione dell'mRNA per la sintesi del primo filamento di cDNA.

4.7.4 Trattamento dell'RNA con DNase I

Tale trattamento si effettua per eliminare eventuali contaminazioni da DNA dell'RNA isolato RNA, allestendo reazioni dal volume finale di 30 μ l. A 10 μ g di RNA risospeso in 20 μ l di acqua DEPC, vengono aggiunti 3 μ l 10X DNase I Buffer (NEB), 3 μ l 2U/ μ l DNase I (NEB). Indi la miscela di reazione viene portata al volume finale di 30 μ l e lasciata in incubazione a 37°C per 30 minuti. Indi per far precipitare gli acidi nucleici e bloccare l'attività DNasica si aggiungono 3 μ l di 3M Acetato di Sodio (pH 7,0) e 90 μ l di etanolo 96%, e si procede poi con incubazione alla temperatura di -80°C per 10 minuti. La miscela viene poi centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti (4°C). Il pellet ottenuto è stato risospeso in 22 μ l di acqua sterile. Prima di procedere alla sintesi del primo filamento di cDNA, l'RNA così ottenuto incontaminato, viene quantificato allo spettrofotometro.

4.7.5 Sintesi del cDNA

A 2 μ g di RNA trattato con DNase I, RNA <<DNA free>>, sono stati aggiunti 1 μ l di primer oligo d T (0,5 μ g / μ l) ed acqua sterile fino ad un volume di 12 μ l. La miscela viene incubata a 70°C per 5 minuti e poi immediatamente posta in ghiaccio.

Dopo aggiunta di 4 μ l di 5X Reaction buffer, 1 μ l di Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor e 2 μ l di 10mM dNTP mix, si centrifuga e si fa incubare la miscela a 37°C per 5min, e infine dopo aggiunta di 1 μ l di Revertaid™ M-MuLV Transcriptase (200 U/ μ l), i campioni vengono incubati a 42°C per 60 min e il cDNA così ottenuto conservato a-20°C.

4.7.6 Controllo della sintesi del cDNA

Il controllo dell'avvenuta sintesi del cDNA si effettua mediante l'amplificazione di una porzione del gene *EF1- α* , costitutivo in pianta, utilizzando i primer PcLeEF Fw e PcLeEF Rw (Tab.5). Per l'allestimento della reazione di PCR come descritto nel par. 4.6.2, viene impiegato 1 μ l di cDNA. In tab.5 sono descritte le condizioni base di amplificazione. L'amplificato viene poi sottoposto ad elettroforesi su gel.

4.7.7 Real Time RT-PCR

L'analisi di espressione genica tra 2 o più genotipi dei trasformanti della cv "Red Setter", è stata effettuata mediante Real Time RT-PCR. Le reazioni di Real Time PCR sono state allestite in un volume di 25 µl, aggiungendo a 4 µl di cDNA, diluito 10 volte, sono stati aggiunti 12,5 µl di 2X SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,75 µl di entrambi i primer 10 mM. La reazione portata a volume finale di 25 µl, è stata incubata nel termociclatore 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Le amplificazioni sono state effettuate includendo una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di appaiamento alla Ta dei primer (Tab. 5) per 15 secondi. Il ciclo di amplificazione prevede due step preliminari di 50°C per 2 min e di 95°C per 10 min e la macchina è stata settata per registrare i dati di fluorescenza nella fase di appaiamento dei primer. Ogni amplificazione viene ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza vengono poi analizzati con il software 7000 System SDS Software (Applied Biosystems) per il calcolo dei valori dell'RQ (*Relative Quantification*) con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). I valori dell'RQ sono stati ottenuti utilizzando il gene endogeno *EF1-α* come riferimento, di cui è stata amplificata una regione utilizzando i primer PcEF1 FW Rt e PcEF1 RW Rt (Tab. 5).

4.8 Analisi del locus Mi

Per l'analisi del *locus Mi* dei trasformanti della cv "Red Setter", è stata fatta amplificazione del marcatore molecolare CAPS-REX-1 (Williamson *et al.*, 1994) in quanto associato al gene *Mi* di resistenza ad afidi e nematodi (Rossi *et al.*, 1998). Per l'amplificazione del marcatore è stata utilizzata la coppia di primer Mi REX-1 Fw e Mi REX-1 Rv (Tab. 5). Dopo la visualizzazione della banda attesa dell'amplificato mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% in Buffer TAE 1X, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a digestione mediante l'enzima di restrizione Taq I. La reazione è stata allestita in un volume finale di 20 µl, aggiungendo a 17,5 µl della reazione di PCR, 0,5 µl di enzima di restrizione (1U/ µl) e 2 µl di Buffer 1X. Dopo incubazione per 3 ore della miscela di reazione, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% per verificare l'avvenuta digestione.

4.9 Saggi biologici di resistenza ad agenti biotici delle piante transgeniche della cv “Red Setter”

4.9.1 Allevamento di afidi sul genotipo “Red Setter”

L'afide *M. euphorbiae* è stato allevato sulla cv “Red Setter” di *Solanum lycopersicum*. Data la grande plasticità genetica degli afidi, è stata effettuata una selezione durata 2 mesi, con periodico inoculo di afidi adulti e neanidi al fine di costituire un allevamento stabile.

4.9.2 Saggi biologici con *Alternaria solani*

Piante transgeniche del genotipo RSYS 24 e relativo controllo Red Setter, sono state sottoposte a saggi biologici di resistenza al patogeno *Alternaria solani*. Da ciascuna pianta sono state prelevate 4 foglie composte e su ogni fogliolina della foglia composta sono stati effettuati 2 inoculi, per un totale di 50 inoculi/genotipo. Utilizzando una concentrazione di 1.8×10^7 spore/ml del patogeno in tampone di germinazione, sono stati effettuati inoculi di 10 μ l negli spazi internodali, contrassegnando il sito in cui è stato fatto l'inoculo mediante un punto nero per il rilievo delle aree necrotiche di sviluppo del patogeno. Il saggio è stato effettuato in camera di crescita a 25°C, al 100% di umidità relativa, ed un fotoperiodo di 16 h luce/ 8 h buio. Per il monitoraggio, è stata eseguita la misurazione delle lesioni dopo 48, 72, 96 e 168 ore dall'inoculo.

4.9.2.1 Preparazione dell'inoculo di *Alternaria solani*

Per l'inoculo sono state utilizzate spore ottenute da colture su substrato solido di sporulazione PDA (Potato Dextrose Agar). Capsule petri contenenti PDA, sono state inoculate con 20 μ l di una sospensione batterica ad una concentrazione di 1×10^6 spore/ml e lasciate in incubazione per 10 giorni a 25°C ed in condizioni di luce diffusa. Indi le spore sono state risospese in 8 ml di acqua sterile e separate dai conidi mediante filtrazione su lana di vetro. Dopo diluizioni seriali della soluzione ottenuta, è stata effettuata una conta delle spore in camera contaglobuli di Burkner, per il raggiungimento di una concentrazione ottimale di 10^7 spore/ml. Tale sospensione quindi con una concentrazione di 10^7 spore/ml, aggiunta al tampone è stata utilizzata per effettuare gli inoculi nei saggi biologici con *Alternaria solani* sul genotipo transgenico RSYS 24 della cv “Red Setter” sovraesprimente la sistemina

4.10 Incroci per l'ottenimento di linee di pomodoro Mi che sovraesprimono il gene della Prosistemina (PROSYS)

Con gli incroci effettuati, finalizzati allo studio della combinazione di più geni di resistenza, si è voluto introdurre il gene PROSYS nella cv BB unitamente al gene Mi di resistenza agli afidi, e analogamente nella cv RG (Sys-Sys- mimi). Semi di pomodoro di piante transgeniche della cv "Better Boy" per il gene della prosistemina posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S del CaMV (siglate BBS), e che includono nel proprio background anche il gene Mi di resistenza agli afidi (Sys+Sys+MiMi); semi di del corrispondente controllo non trasformato (piante siglate BB), della stessa cv e che non include il gene Mi (Sys-Sys- mimi); e semi di piante di pomodoro della cv RG (Sys-Sys- mimi), cioè caratterizzate dalla stessa condizione allelica di BB (Sys-Sys- mimi), sono stati messi a germinare in piastre Petri contenenti dischi di carta da banco imbevuti di acqua per 4-5 giorni in condizioni di buio a 22-24°C. Dopo tale periodo, le piantine sono state trapiantate in vaso e trasferite in camera di crescita dove la temperatura è di 22-24°C e vengono rispettati cicli di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Indi le piante sono state trasferite su bancale in serra allo stadio di 3^a-4^a foglia vera, e con la sincronizzazione della fioritura si è proceduto con gli incroci. La fioritura nei due genotipi inizia infatti in maniera sfalsata in quanto il genotipo BB fiorisce prima del corrispondente transgenico BBS, inoltre si è notata differenza nell'architettura della pianta soprattutto per le piante sottoposte a stress idrico, in quanto le piante BBS risultano brachitiche, con internodi più raccorciati rispetto al corrispondente controllo BB. Dalle bacche allegate dai vari incroci effettuati (BB ♀ x BBS ♂) ed (RG ♀ X BBS ♂), è stato estratto il seme. Alcune di queste bacche però non hanno dato seme e potrebbero essere di origine partenocarpica, ed in generale il numero di semi è esiguo.

4.10.1 Analisi fenotipica e citologica dei parentali

I parentali, piante della cv "Better Boy" (BB) che sovraesprimono costitutivamente la sistemina sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico per l'individuazione di piante con fenotipo poliploide da scartare come parentali, in quanto piante che derivano dalla coltura *in vitro*. I genotipi delle piante parentali BB e BBS sono stati quindi caratterizzati dal punto di vista morfologico, poiché la morfologia osservata suggeriva la possibile presenza di individui poliploidi. Infatti differenze morfologiche sono emerse tra piante BBS fortemente indicative della presenza di genotipi poliploidi tra queste piante rigenerate *in vitro*. Il livello di ploidia superiore al diploide, infatti, può essere indotto durante la fase di rigenerazione *in vitro* con frequenza variabile in relazione al genotipo, all'espianto e al contenuto ormonale (in particolare auxinico) del substrato. L'individuazione di piante transgeniche poliploidi è importante anche ai fini del trasferimento genico via incrocio, in quanto la poliploidia può comportare sterilità. Le piante poliploidi sono state individuate sulla base della morfologia fogliare (van den Bulk *et al.*, 1990; Habashy *et al.*, 2004). Piante con foglia di colore verde scuro, meno compatte con foglioline spesse, a margine meno seghettato, sono state considerate poliploidi. Mettendo a punto un protocollo per il pomodoro è stata effettuata l'analisi citologica sulle piante con fenotipo poliploide che ha confermato l'effettiva differenza tra fenotipo normale e fenotipo poliploide sulla base del numero di cloroplasti nelle cellule di guardia degli stomi. All'analisi morfologica è seguita uno screening citologico per verificare il livello di ploidia per

tutte le piante ritenute poliploidi su base fenotipica, in base al numero medio di cloroplasti per cellula di guardia degli stomi, secondo il metodo di Kornneef (Koorneef *et al.*, 1989). Tale metodo si basa sulla constatazione che il numero di cloroplasti nelle cellule di guardia degli stomi di piante tetraploidi è consistentemente maggiore di quello che si osserva in piante diploidi. Il livello di ploidia è stato verificato su un campione di 12 piante della cv Better Boy transgeniche per l'espressione costitutiva della sistemina (McGurl *et al.*, 1994), siglate BBS, che all'analisi morfologica presentavano fenotipo anomalo tipico di piante poliploidi e/o aneuploidi e cioè rispettivamente le piante: BBS3, BBS4, BBS7, BBS11, BBS12, BBS14, BBS15, BBSI.5, BBSI.6, BBSI.9, BBSI.10, BBSI.12; e analogamente su un campione di piante transgeniche per la sistemina ma con fenotipo normale e cioè le piante: BBS2, BBS6, BBS8, BBS9, BBS10, BBSI.7, nonché su un campione di 12 piante BB non trasformate per il gene della prosistemina. Da ciascuno di questi genotipi è stato prelevato un campione costituito dalle foglioline della parte distale, e posti in capsule petri con acqua sterile e in ghiaccio per il trasporto dalla serra. In laboratorio si procedeva alla preparazione della porzione di epidermide da osservare al microscopio. Servendosi di una pinzetta, si staccavano strisce di epidermide le quali venivano stese su un vetrino, bagnate con una goccia di acqua sterile e quindi ricoperte con vetrino copri oggetto, schiacciando leggermente per non rompere le cellule e causare la dispersione dei cloroplasti. Sul vetrino così preparato, si contavano al microscopio il numero medio di cloroplasti per cellula di guardia di trenta stomi. E' stata fatta l'analisi statistica dei dati (T test).

Per verificare la eventuale presenza di modifiche del numero cromosomico, si è cercato di mettere a punto un idoneo protocollo specifico per l'analisi meiotica e mitotica in pomodoro (Habashy *et al.*, 2004.), finalizzato ad un ulteriore arricchimento dei dati dell'analisi morfologica e citologica effettuata, con l'analisi meiotica dei bocci fiorali e l'analisi mitotica su apici radicali di talee prelevate da piante BBS e dal corrispondente controllo BB.

4.10.2 Selezione dei genotipi mediante PCR e analisi CAPS

Gli incroci hanno cioè consentito di ottenere ricombinanti dei parentali BB (Sys-Sys-mimi), RG (Sys-Sys-mimi) e BBS (Sys+Sys+MiMi), come si è potuto appurare dalle analisi molecolari svolte (PCR e CAPS). Per scremare le piante ottenute dai programmi di incroci mediante PCR, è stata utilizzata una coppia di primer, denominati BB-BBS fw (5'-GGGAGGGTGCCTAGAAATAA-3') e BB-BBS rv (5'-TTGCATTTGGGAGGATCACG-3), che in base alle dimensioni del frammento amplificato, consente di discriminare tra il gene della prosistemina e il cDNA del transgene. Tali primers si appaiono su due esoni consecutivi del gene della prosistemina di pomodoro, separati da un introne. Di conseguenza l'amplificazione di DNA estratto da piante transgeniche da origine a due bande: una di 717 bp, corrispondente all'amplificazione del gene endogeno (regione codificante e introne) e una di 110 bp relativa al costrutto transgenico (cDNA e quindi solo regione codificante). Nelle piante non trasformate, invece, si ottiene un'unica banda di 717 bp dovuta all'amplificazione del solo gene endogeno (fig 4).

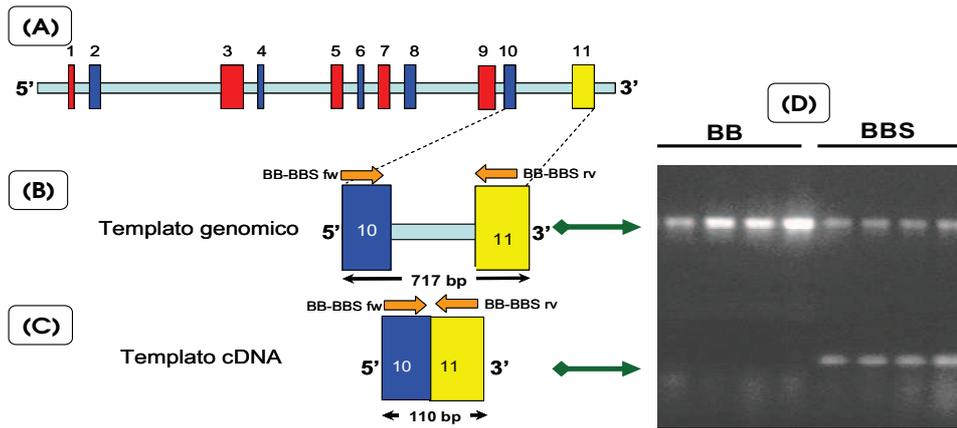
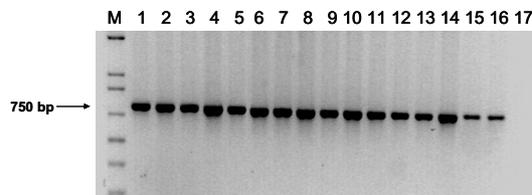


Fig.4-(A) Rappresentazione schematica del gene endogeno della prosistemia. I rettangoli indicano gli esoni; (B) appaiamento del primer BB-BBS rv (in arancione) sul gene endogeno della prosistemia; (C) appaiamento del primer BB-BBS rv sul transgene contenente il cDNA della prosistemia; (D) esempio di amplificazione di piante BB (test) e BBS (transgeniche)

1) Amplificazione con primer locus specifici (750 bp)



2) Digestione con l'enzima Taq I degli amplificati

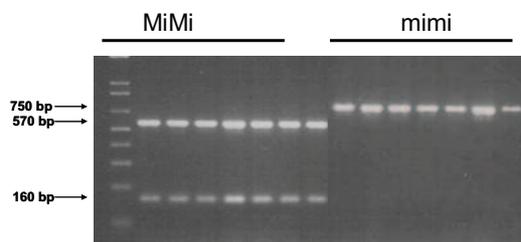


Fig.5- Analisi CAPS del marcatore REX1 strettamente associato al gene Mi

Con l'analisi CAPS (Fig. 5), il marcatore codominante CAPS REX-1 permette l'individuazione del locus Mi con l'amplificazione di un frammento di 750 bp sia nelle piante resistenti che in quelle suscettibili. La digestione degli amplificati con l'enzima Taq I permette la discriminazione tra l'omozigote (R/R) e l'eterozigote (R/S), grazie al polimorfismo delle basi che costituiscono il sito di taglio per l'enzima di restrizione Taq I. Tale sito, infatti, è presente nella sequenza del locus delle piante resistenti ma non in quelle suscettibili. Quindi per le piante resistenti si avrà digestione del frammento amplificato e si osserveranno due bande di 570 bp e 160 bp; mentre per le piante suscettibili vi sarà assenza del taglio enzimatico con la conseguente visualizzazione di una sola banda (Williamson *et al.*, 1994).

5. RISULTATI

5.1 Trasformazione genetica del pomodoro per il gene della prosistemina

5.1.1 Il plasmide pMZ

Il plasmide pMZ utilizzato per gli esperimenti di trasformazione deriva da un vettore binario che all'interno della sequenza del T-DNA, oltre al gene selezionatore di resistenza a Kanamicina, contiene una cassetta di espressione in cui, utilizzando gli enzimi di restrizione XbaI e HindIII, è stata inserita una sequenza di cDNA codificante per gli esoni 10 ed 11 della prosistemina, sotto l'azione del promotore costitutivo CaMV 35S e del terminatore RbcS .

5.1.2 Trasformazione genetica del pomodoro con il gene della prosistemina della cv Rio Grande (RG)

Per gli esperimenti di rigenerazione e trasformazione genetica della cv Rio Grande, miranti all'ottenimento di un protocollo ottimale sono stati utilizzati per l'inoculo i due ceppi di *A. tumefaciens* LBA4404 ed EHA105, 3 differenti varianti di un protocollo di trasformazione ed oltre ad espianti cotiledonari sono stati utilizzati anche espianti fogliari. Mentre negli esperimenti di trasformazione con espianti cotiledonari è stata osservata solo callogenese, negli esperimenti con espianti fogliari, sono stati ottenuti solo 6 germogli da un unico callo (Fig. 6). All'analisi morfologica, le piante allevate dei pochi rigeneranti ottenuti da espianti fogliari, mostrano fenotipo normale e buona fertilità. L'unico risultato puramente indicativo di questo esperimento è che i pochi germogli ottenuti dagli espianti fogliari si sono rigenerati molto più velocemente rispetto a quanto avviene per la rigenerazione da espianti cotiledonari. La caratterizzazione molecolare di tre piante T₁ sopravvissute in vivo confermerà l'avvenuta introgressione del transgene.



Fig. 6 - Uno dei rigeneranti (6) da espianto fogliare ottenuti da singolo callo

5.1.3 Trasformazione genetica del pomodoro con il gene della prosistemina della cv Red Setter

Ottimi risultati sono stati conseguiti dagli esperimenti di trasformazione della cv Red Setter con *A. tumefaciens* ceppo LBA4404.

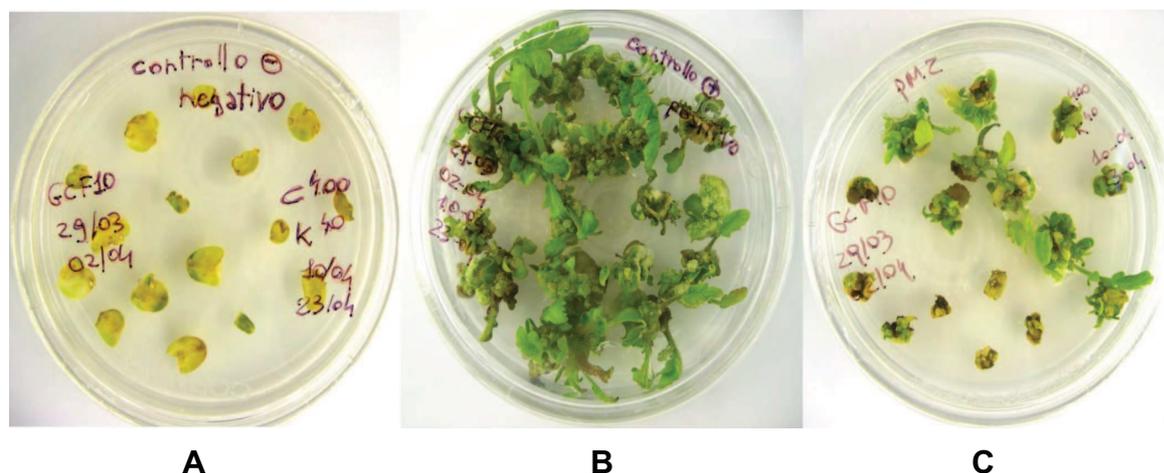


Fig. 7-Trasformazione della cv Red Setter di pomodoro con il gene *Prosys*: C) Espianti co-coltivati con *A. tumefaciens*; A) Espianti su substrato contenente 50 mg/l di Kanamicina (controllo di selezione); B) Espianti su substrato di rigenerazione (controllo di rigenerazione)

Per gli esperimenti di trasformazione sono stati utilizzati espianti non co-coltivati con l'Agrobatterio rispettivamente come controllo di selezione (controllo negativo), un controllo di rigenerazione (controllo positivo). La fig. 7 mostra che l'impiego di tali espianti-test, consente di rilevare dal confronto con il controllo negativo la concentrazione impiegata di 50 mg/l di Kanamicina è sufficiente per selezionare gli espianti trasformati, e dal confronto con il controllo positivo che il GCF10 è un buon substrato di rigenerazione da espianti cotiledonari per la cv "Red Setter".

A distanza di una, quattro e sette settimane dall'evento di trasformazione, dai calli formati sono stati ottenuti germogli che non hanno mostrato differenze fenotipiche rispetto ai relativi controlli. Da 720 espianti cotiledonari di partenza, dagli esperimenti di trasformazione sono stati ottenuti 440 calli derivanti da singolo espianto. Da ogni callo è stato prelevato un germoglio ed in totale sono stati ottenuti 63 germogli che hanno radicato su substrato selettivo TRI I, contenente Kanamicina. Sono stati selezionati così, gli espianti derivanti da eventi di trasformazione indipendenti. Dalle piantine radicate *in vitro* su terreno di radicazione in presenza di Kanamicina, solo 51 sono riuscite a superare lo stress del trasferimento in vivo, siglate RSYS e numerate in maniera progressiva.

5.2 Screening molecolare delle piante transgeniche della cv di pomodoro Red Setter

Le 51 piante putativamente trasformate per il gene della sistemina, sono state sottoposte a screening molecolare per avere conferma dell'introggressione del transgene. Si è quindi proceduto all'estrazione del DNA genomico da foglia, con conseguente quantificazione. Poiché la cassetta di espressione presente nel plasmide pMZ contiene il promotore 35S², si può scrinare la presenza del transgene amplificando una regione del promotore. La fig. 8 mostra che dalla reazione PCR del DNA estratto dai rigeneranti ottenuti, impiegando primer Pc35SpHannFW e Pc35SpHannRv, è stato ottenuto l' amplificazione di una regione di 212 bp del promotore 35S². L'elettroforesi mostra il frammento delle dimensioni attese in 17 campioni RSYS. Lo screening molecolare della progenie T₀ quindi ha consentito di individuare 17 piante effettivamente trasformate, l'efficienza di trasformazione calcolata sulla base di questi dati è del 2,36%. La tab. 6 riassume i dati degli esperimenti di trasformazione della cv Red Setter di *Solanum lycopersicum*.

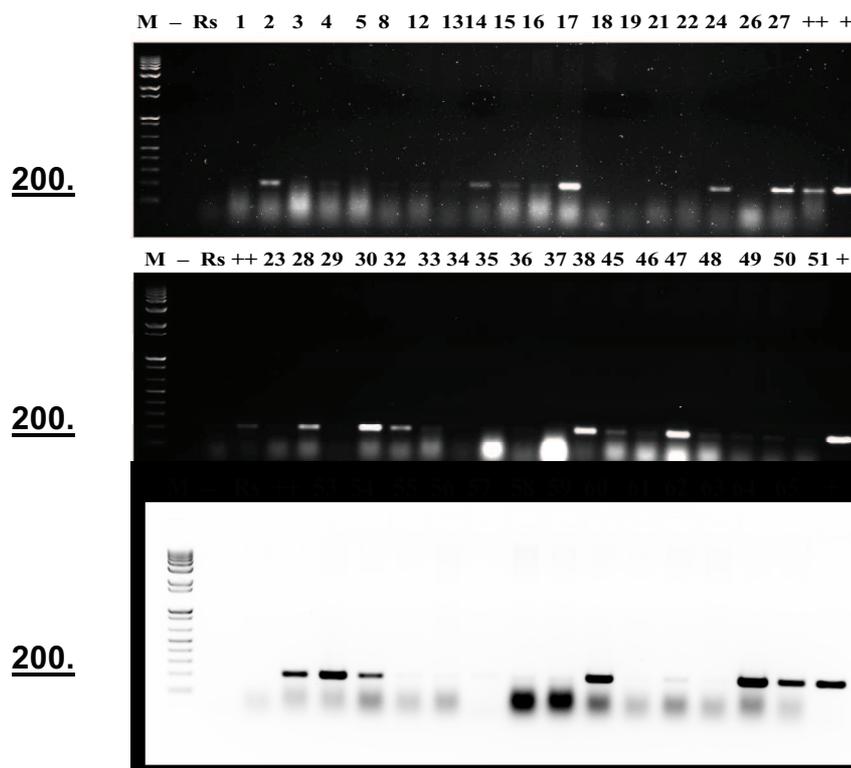


Fig. 8 -Analisi PCR dei rigeneranti putativamente trasformati Ottenuti dalla trasformazione della cv Red Setter

Tab. 6 Dati riassuntivi della trasformazione della cv Red Setter di *Solanum lycopersicum*

Espianti di partenza	720	%
Calli ottenuti	440	61,1
Germogli rigenerati	350	48,6
Germogli radicati	63	8,75
Plantule in vivo	59	8,19
Piante ottenute	51	7
Piante positive alla PCR	17	2,36

5.2.1 Analisi di espressione della progenie T₀

Per valutare il profilo di espressione del gene della prosistemina, la popolazione di piante T₀ ottenuta dalla trasformazione, è stata analizzata mediante Real Time RT-PCR. Da foglie completamente espanse di una pianta Red Setter da utilizzare come test, e da 15 piante RSYS, è stato isolato l'RNA ed indi quantificato mediante lo spettrofotometro. Tutti i campioni hanno mostrato un indice di purezza alto, molto vicino a 2, attribuito all'RNA puro, inoltre l'elettroforesi su gel al 1,2% ha mostrato le bande dell'RNA ribosomiale integre. Per eliminare eventuali contaminazioni di DNA è stato fatto un trattamento con DNAsi, seguito dalla sintesi del primo filamento di cDNA. Il cDNA è stato analizzato mediante PCR utilizzando i primer Pc-LeEF FW e Pc-LeEF Rw. Questi primer appaiono fra due esoni consecutivi del gene EF1- α , un gene espresso costitutivamente in tutti i tessuti vegetali di pomodoro (Pokalsky *et al.*, 1989). Questi primer possono discriminare fra DNA genomico e cDNA poiché quest'ultimo non presenta le sequenze introniche e quindi produce un frammento di amplificazione (687 bp) più piccolo rispetto al DNA genomico (767 bp). I prodotti di PCR ottenuti sono poi stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 1,5%. Il cDNA ottenuto dalle piante è stato poi analizzato mediante *Real-Time* RT-PCR per verificare il livello di espressione della prosistemina utilizzando i primer Pc-BBSBB FW e Pc-BBSBB RW che appaiono rispettivamente sugli esoni 10 e 11 della prosistemina e analogamente sulla cassetta di espressione del plasmide pMZ.

La Real Time RT-PCR è una tecnica che permette di quantificare l'espressione della prosistemina nelle piante transgeniche rispetto a quelle controllo. E' stata così effettuata una quantificazione relativa dell'espressione del gene utilizzando come calibratore il genotipo "Red Setter". I dati di fluorescenza sono stati standardizzati con quelli ottenuti dall'amplificazione del gene di riferimento EF1- α . La fig. 9 rappresenta l'analisi di espressione su 15 piante transgeniche, fissando come calibratore il genotipo non trasformato "Red Setter". I valori di espressione del transgene sono stati calcolati con il metodo del $\Delta\Delta C_T$ (Livak e Schmittgen, 2001) che rilascia l'indice RQ (Relative Quantification). I trasformanti nella T₀ mostrano vari livelli di espressione del gene della prosistemina, raggiungendo un picco massimo di espressione nel genotipo RSYS 24, che infatti sovraesprime il gene 95 volte in più rispetto al controllo non trasformato, un alto livello di espressione si rileva anche nel genotipo RSYS 32 con un RQ di 62, in generale le piante transgeniche RSYS sovresprimono il gene più del corrispondente controllo non trasformato, un'eccezione

nel campione di queste 15 piante è costituita dal genotipo RSYS 17 che infatti è sottoespresso con un RQ pari a 0,3, probabilmente a causa di inserzioni di copie multiple del transgene.

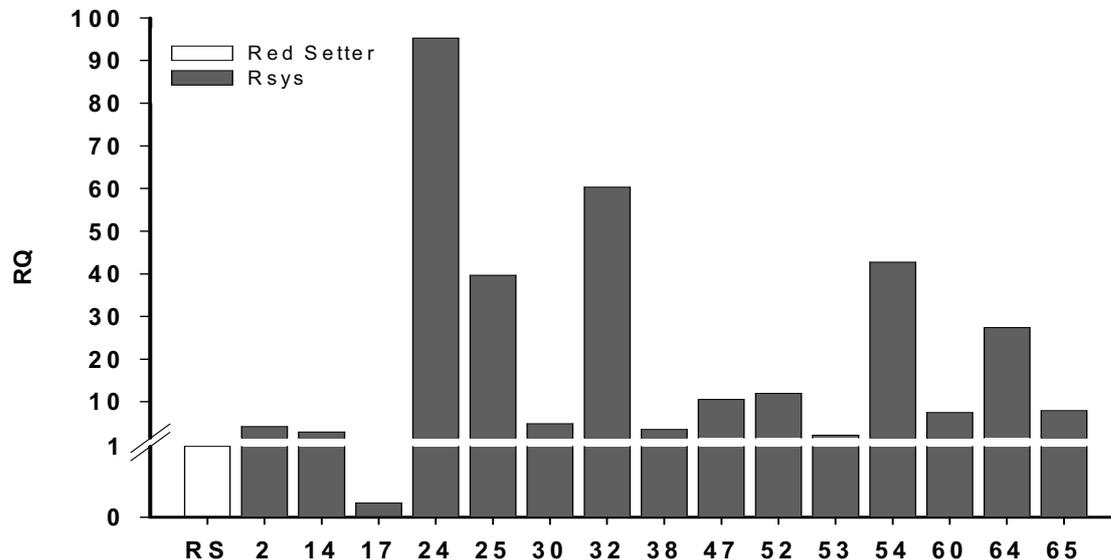


FIG. 9- Quantificazione relativa del gene della prosistemina mediante Real Time RT-PCR. Il grafico mostra valori RQ relativi al calibratore RS dei diversi campioni RSYS (progenie T₀)

5.2.2 Caratterizzazione ed analisi di espressione della popolazione T₁

Dalla germinazione di 50 semi T₁ estratti da bacche di un campione di 4 piante T₀, e cioè rispettivamente dai 4 genotipi RSYS 24, 32, 38 e 54 (selezionati in base ai valori di RQ calcolati mediante *Real-Time* RT-PCR e che costituiscono un campione dei genotipi più rappresentativi della popolazione T₀), sono state ottenute piante della progenie T₁. Le piante T₁ sono state sottoposte a screening molecolare mediante PCR con i primer Pc35SpHann Fw e Pc35SpHann Rv, per l'amplificazione di una regione del promotore 35S². Le piante T₁ risultate positive a PCR e quindi transgeniche per il gene Prosys della prosistemina, sono state allevate in camera di crescita. La fig. 10 mostra singole piante corrispondenti a ciascun genotipo selezionato. L'osservazione fenotipica denota che le piante che sovraesprimono in maniera costitutiva la sistemina, presentano una taglia ridotta rispetto alle corrispondenti piante "Red Setter" non trasformate della stessa età, cioè allo stesso stadio fenologico (fig.10).



RS

RSYS 24

RSYS 32

RSYS 38

RSYS 54

Fig. 10 - Confronto tra fenotipo di piante trasformate (a destra) e tra pianta "Red Setter" (RD) controllo (a sinistra) di *Solanum Lycopersicum*

Analogamente a quanto già descritto in letteratura per piante transgeniche della cv Better Boy sovraesprimenti la sistemina, il transgene influisce sul modello architetturale della pianta con sviluppo di individui fortemente tendenti al dwarf.

Singole piante (i genotipi RSYS 24, 32, 38 e 54) ed una pianta "Red Setter" (RD), sono state sottoposte ad analisi di espressione mediante *Real-Time* RT-PCR per confermare i livelli di espressione ottenuti nella progenie T₀ e verificare cioè se le piante sovraesprimono stabilmente nel passaggio da una generazione alla successiva. Anche per la T₁ si è proceduto all'estrazione dell'RNA totale da foglia, quantizzato poi allo spettrofotometro e visualizzato su gel di agarosio, mostrando un grado di elevata purezza ed integrità.

Si è poi analogamente proceduto anche al controllo della sintesi del cDNA, mediante l'amplificazione del gene EF-1 α .

L'analisi di espressione sulla progenie T₁ (fig.11), ha confermato gli stessi livelli verificati nella progenie T₀ (fig. 9), confermando la stabilità genetica di un materiale vegetale che pertanto rappresenta un modello ideale di pianta transgenica sovraesprimente costitutivamente la sistemina, per la valutazione degli effetti quantitativi della prosistemina nell'attivazione di geni coinvolti nella difesa diretta della pianta.

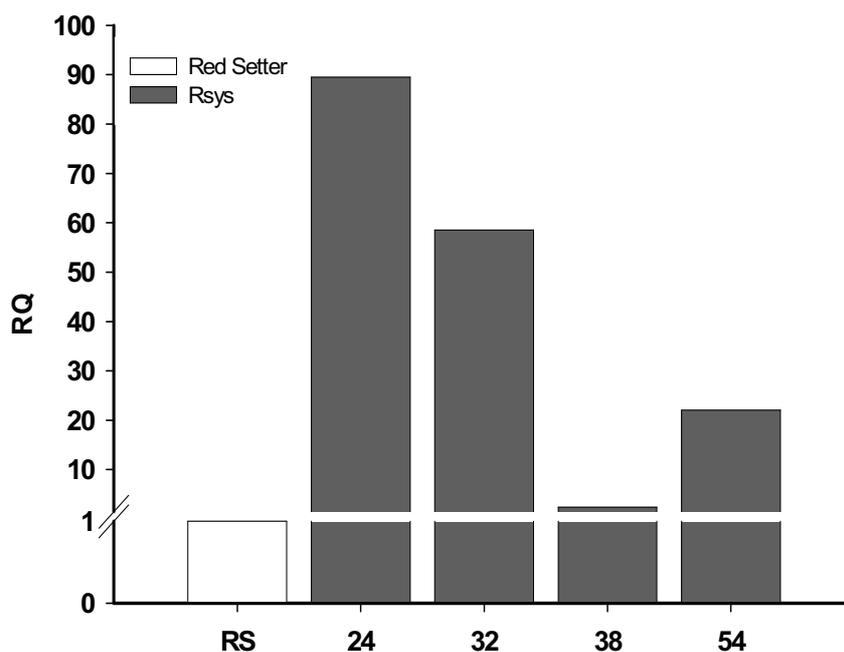


Fig. 11- Quantificazione relativa del gene della prosistemina mediante Real Time PCR RT-PCR. Il grafico mostra i valori RQ relativi al calibratore RS dei campioni RSYS 24, 32, 38 e 54 (progenie T₁)

5.3 Saggi biologici

5.3.1 Saggi biologici di piante transgeniche RSYS con *Alternaria solani*

Per valutare la resistenza delle piante transgeniche RSYS contro il fungo fitopatogeno *Alternaria solani*, i saggi di resistenza hanno previsto il prelievo di 4 foglie prelevate da due piante del genotipo transgenico RSYS 24 e 4 dal controllo. Per tali saggi il genotipo transgenico RSYS 24 è stato scelto come materiale vegetale elettivo, perché è il genotipo che presenta i più alti livelli di sovraespressione rispetto al controllo non trasformato. Le lesioni provocate dal fungo fitopatogeno sono state osservate dopo 48, 72, 96 e 168 ore dall'inoculo. Le lesioni rilevate sulle foglie di piante transgeniche, sono di dimensioni ridotte rispetto a quelle comparse sulle foglie del relativo controllo in seguito all'inoculo. Inoltre per le foglie prelevate da piante transgeniche RSYS è stato osservato una manifestazione più lenta dei sintomi di necrosi confrontandole con quelle del genotipo non trasformato. Infatti una settimana dopo l'inoculo, mentre nel controllo non trasformato le foglie risultano completamente interessate da necrosi, invece in quelle del genotipo transgenico le dimensioni delle lesioni necrotiche risultano localizzate ed inalterate nel tempo. Per poter quantificare tali differenze sono stati misurati i diametri delle aree necrotiche, utilizzati per il calcolo delle aree medie delle lesioni registrate sulle piante transgeniche e sulle piante controllo della cv Red Setter, e dal calcolo dei valori medi e della deviazione standard di tutti i valori. Le considerazioni basate sulle osservazioni visive delle necrosi, sono state confermate dai dati numerici ottenuti dei rilievi effettuati. Le aree necrotiche sulle piante "Red Setter" interessano una più ampia superficie fogliare rispetto a quelle su piante RSYS, e questa differenza

umenta in relazione al tempo trascorso dall'inoculo. Una settimana dopo l'inoculo infatti, mentre le aree necrotiche su foglie di piante "Red Setter" raggiungono valori di 160 mm², quelle su foglie di piante RSYS invece non superano valori di 10 mm² (fig. 12).

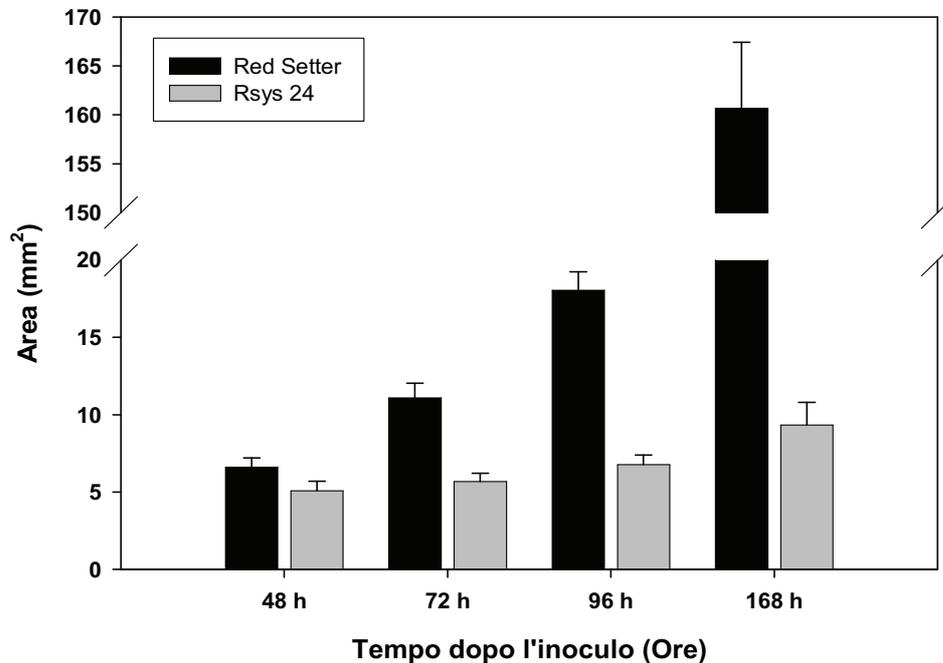


Fig. 12- Rappresentazione grafica dell'area di necrosi in funzione del tempo di inoculo del fungo *Alternaria solani*

5.3.2. Analisi del locus *Mi* in piante RSYS

E' stato analizzato lo stato del *locus Mi*, in quanto in letteratura si riporta che la presenza dell'allele dominante nelle piante di pomodoro determina la resistenza all'afide della patata *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.*, 1998). Per l'analisi è stato utilizzato il marcatore CAPS REX-1, strettamente associato al *locus Mi* (Williamson *et al.*, 1994). Per realizzare queste analisi, il DNA genomico estratto da alcune piante RSYS della progenie T₁, è stato amplificato con i primer Mi REX-1 Fw ed Mi REX-1 Rv, indi è stata effettuata la separazione elettroforetica dei prodotti per verificare la presenza della banda attesa di 750 bp. Poi il DNA amplificato è stato digerito con l'enzima di restrizione *Taq I*, per verificare se il *locus* fosse associato ad una condizione di dominanza (piante resistenti), o recessività (piante suscettibili). Come controllo positivo della digestione si è utilizzato l'amplificato della cv "Motelle", omozigote per il gene di resistenza *Mi* (Cooper *et al.*, 2004).

L'analisi CAPS ha rilevato che la cv "Red Setter" ed i corrispettivi genotipi transgenici, presentano il *locus Mi* in condizioni di omozigosi recessiva e quindi non hanno l'allele di resistenza a *Macrosiphum euphorbiae*.

5.3.3 Saggi biologici di piante transgeniche RSYS con afidi

Sono stati allestiti saggi di resistenza ad afidi scegliendo come materiale vegetale oltre al controllo non trasformato della cv "Red Setter", tra i trasformanti RSYS

ottenuti, il genotipo RSYS 24 cioè quello che presenta il picco massimo di sovraespressione della sistemina rispetto al relativo controllo non trasformato. Dopo trasferimento di una singola neanide su ogni pianta, ogni giorno è stata monitorata la presenza della neanide. Nessuna neanide allevata su RSYS 24 è arrivata all'età riproduttiva ed inoltre la longevità registrata raggiunge livelli molto più bassi che nel corrispondente controllo non trasformato (tab.7 e grafico fig.13)

Tab. 7-Longevità degli afidi allevati sul genotipo RSYS a confronto con quello di afidi allevati su piante controllo della cv Red Setter di *Solanum lycopersicum*

N°piante	Genotipo	Longevità
42	RSYS	1,190476
24	Red Setter	2,416667

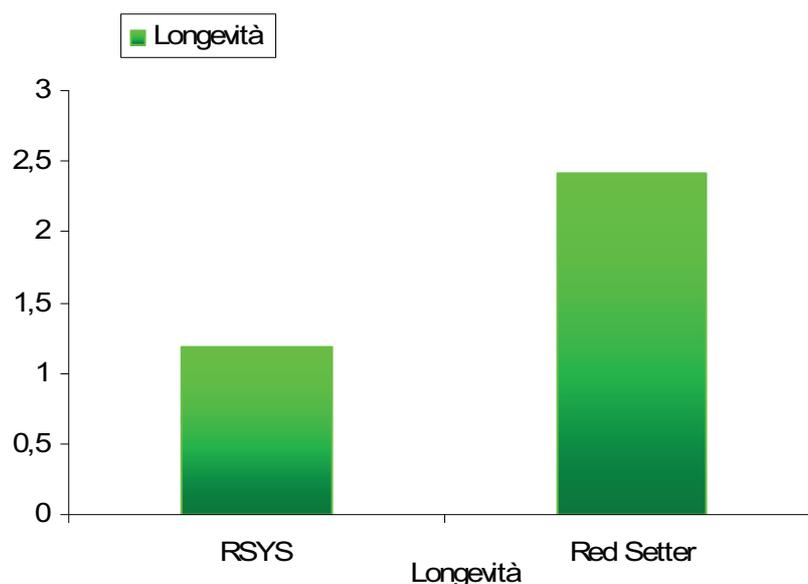


Fig. 13- Longevità di afidi allevati su piante RSYS, a confronto con quella di afidi allevati su piante controllo

5.4 Incroci

Gli schemi di incrocio hanno previsto:

- ottenimento di piante F1 dall'incrocio dei due parentali (BB ♀ x BBS ♂) e di piante F1 dall'incrocio (RG ♀ X BBS ♂), note le rispettive situazioni alleliche dei parentali
- backcross con i rispettivi parentali per recuperare tutti i caratteri propri di RG, delle piante F1 ottenute dall'incrocio (RG ♀ X BBS ♂) e risultate positive alle analisi molecolari effettuate. Oltre che a screening mediante PCR, i putativi ricombinanti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi CAPS per verificare la situazione allelica al *locus Mi*;
- ottenimento di seme F2 per autofecondazione di alcune piante F1 dell'incrocio (BB ♀ x BBS ♂) scriniate mediante PCR e risultate positive per l'introggressione del transgene;
- caratterizzazione molecolare (PCR e analisi CAPS) delle piante F2 ed ottenimento di seme F3 per autofecondazione;
- reincrocio (BC1) della F₁ dell'incrocio (RG ♀ X BBS ♂), risultati positivi all'analisi PCR per il gene *Prosys*,
- analisi molecolare (PCR e CAPS) delle piante BC1 ottenute e reincrocio con il parentale RG (BC2)

Per l'incrocio BBXBBS è stato ottenuto seme da 10 dei 22 incroci allegati, con una produzione complessiva di 331 semi F1 ed una produzione media di 33 semi/bacca. Relativamente invece all'incrocio RGXBBS, è stato ottenuto seme da 9 dei 38 incroci allegati con una produzione complessiva di 244 semi F1 ed una produzione media di 27 semi/bacca. Alcune bacche non hanno prodotto semi e potrebbero essere di origine partenocarpica.

5.4.1 Screening molecolare mediante PCR e analisi CAPS dei ricombinanti ottenuti mediante incroci

Dall'autofecondazione di 20 piante F1 dell'incrocio BBXBBS risultate positive a PCR sono stati ottenuti 559 semi F2. Dal reincrocio BC1 di un ibrido F1 risultato positivo a PCR sono stati ottenuti 84 semi BC1. I programmi di incroci per l'ottenimento di linee isogeniche di pomodoro che sovraesprimano costitutivamente la sistemina unitamente al gene *Mi* di resistenza agli afidi, sono stati arricchiti parallelamente da programmi di screening e selezione dei genotipi ottenuti, a partire dalle piante F1 e BC1, mediante PCR ed analisi CAPS. Dall'analisi di 18 piante della F2 sono state selezionate piante (Sys+ Sys+ mimi) e piante (Sys-Sys- MiMi). Gli incroci hanno cioè consentito di ottenere ricombinanti dei 2 parentali BB (Sys-Sys- mimi) e BBS (Sys+Sys+ MiMi), come si è potuto appurare dalle analisi molecolari svolte (PCR e CAPS), da utilizzare come piante modello per effettuare il saggio biologico di valutazione della resistenza ad afidi.

5.4.2 Valutazione citomorfologica di poliploidi



Fig. 14 - cloroplasti/stoma di pianta BBS con fenotipo poliploide

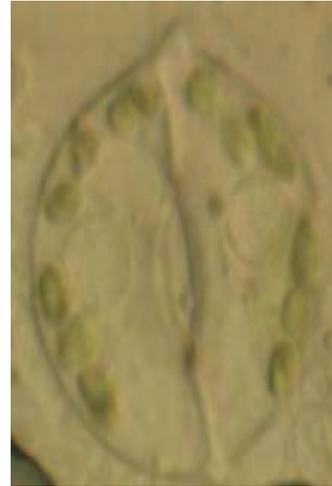


Fig.15 -cloroplasti/stoma di pianta w.type BB

Mettendo a punto un protocollo per il pomodoro è stata effettuata l'analisi citologica su un campione di piante BBS scelte sia tra quelle con fenotipo poliploide che con fenotipo normale, oltre ad un campione di piante BB di due semine consecutive, che ha confermato l'effettiva differenza tra fenotipo normale e fenotipo poliploide sulla base del numero di cloroplasti nelle cellule di guardia degli stomi (tab. 8 e tab. 9, fig.14 e fig. 15, fig. 16). L'analisi statistica ha verificato che le differenze nel numero medio di cloroplasti per stoma tra piante transgeniche BBS e relativo controllo non trasformato BB (mediamente 11 cloroplasti/stoma) sono molto significative ($P < 0,0001$).

Tab. 8 - ANALISI MORFOLOGICA DI GENOTIPI BBS (I SEMINA)

Genotipo	Fenotipo	N medio di cloroplasti/stom a
BBS1	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	- *
BBS2	NORMALE 2n	13,6
BBS3	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	18
BBS4	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	19
BBS5	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBS6	NORMALE 2n	12,5
BBS7	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	19,3
BBS8	NORMALE 2n	19,53
BBS9	NORMALE 2n	11,4
BBS10	NORMALE 2n	13,7
BBS11	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	11,9
BBS12	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	18,06
BBS13	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBS14	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	15,7
BBS15	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	20

*(-) piante di cui è stata fatta solo analisi fenotipica

Tab. 9 - ANALISI MORFOLOGICA DI GENOTIPI BBS (II SEMINA)

Genotipo	Fenotipo	N medio di cloroplasti/stoma
BBSI.1	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.2	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.3	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.4	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.5	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	18,23
BBSI.6	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	18,46
BBSI.7	NORMALE 2n	12,03
BBSI.8	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.9	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	16,8,73
BBSI.10	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	17
BBSI.11	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	-
BBSI.12	ANOMALO (poliploide e/o aneuploide)	18,44

*(-) piante di cui è stata fatta solo analisi fenotipica

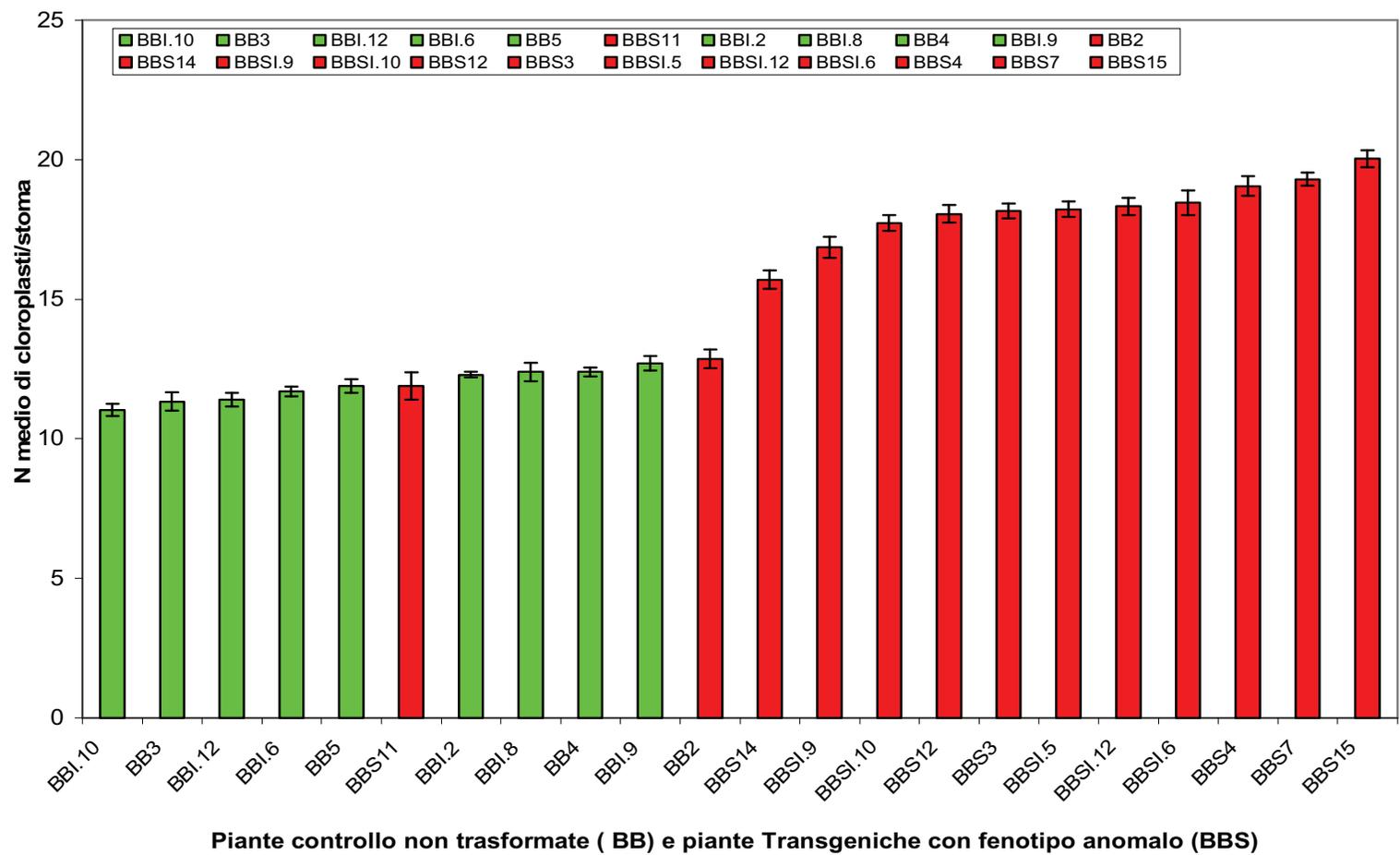


Fig . 16— N. medio di cloroplasti / Stoma di piante transgeniche BBS con fenotipo anomalo e del relativo controllo non trasformato BB

6. DISCUSSIONE

Con questo lavoro di ricerca si è voluto studiare il ruolo della sistemina, importante elicitore considerato il primo ormone vegetale in pianta, capire i meccanismi di difesa diretta ed indiretta espliciti e la risposta di difesa innescata nei confronti non solo di fitofagi e fitomizi, ma anche nei confronti di agenti fitopatogeni come il fungo *Alternaria solani*, e quindi la capacità di questa molecola segnale di innescare arsenali di difesa a largo spettro d'azione e coordinare più risposte diverse di difesa. Si è voluto studiare anche il possibile sinergismo con il gene Mi di resistenza agli afidi in pomodoro. Gli approcci sperimentali sono stati due e cioè, trasformazione genetica ed incroci per l'ottenimento di piante sovraespressanti la sistemina come modello di studio. Negli esperimenti di trasformazione genetica sono state utilizzate due diverse cv di *Solanum lycopersicum*, la cv "Rio Grande" (RG) e la cv "Red Setter"(RD). Per gli esperimenti di trasformazione della cv "Rio Grande" con il gene della prosistemina, sono stati utilizzati sia espianti cotiledonari che fogliari e tre diverse varianti di un protocollo sperimentato come ottimale per la rigenerazione e la trasformazione di questa cv da espianto cotiledonare (Caccia *et al.*, 1998; Schettino *et al.*, 1998). Dagli espianti cotiledonari non sono stati ottenuti germogli ma solo callogenese, ma alcuni espianti fogliari hanno invece rigenerato germogli. I risultati ottenuti non sono apprezzabili, ma i germogli della stessa cv rigenerano più velocemente da espianto fogliare rispetto a quanto avviene per la rigenerazione da cotiledoni, nelle medesime condizioni colturali. Il che è un dato certamente interessante dato che al tempo di permanenza di espianti *in vitro*, oltre che al contenuto ormonale del medium ed al genotipo, è legata la eventuale insorgenza di fenomeni di variabilità somaclonale (Koorneef *et al.*, 1989; Van Den Bulk *et al.*, 1990). Tutti i rigeneranti ottenuti da foglia mostrano poi, fenotipo normale rispetto al corrispondente controllo non trasformato, ed hanno inoltre buona fertilità. Gli esperimenti di trasformazione (effettuati invece come descritto in van Roekel *et al.*, 1993), che hanno consentito di ottenere piante transgeniche per la overespressione costitutiva della sistemina, sono stati quelli relativi alla cv "Red Setter", con un'efficienza di trasformazione del 2,36%. Per gli esperimenti di trasformazione, sono stati utilizzati 2 controlli, quello della rigenerazione (controllo positivo) e quello della trasformazione (controllo negativo). La coltura in parallelo con gli espianti co-coltivati con il ceppo di *A. tumefaciens* utilizzato LBA4404, di espianti controllo per la rigenerazione è stato importante. Infatti dal confronto con il controllo di trasformazione (controllo negativo), è stato possibile rilevare che la concentrazione impiegata di 50 mg/l di Kanamicina (agente selezionatore dei trasformanti), è sufficiente per selezionare gli espianti trasformati della cv "Red Setter" sui substrati utilizzati, mentre dal confronto con il controllo positivo è emerso che il GCF₁₀ è un buon substrato di rigenerazione da espianto cotiledonare per la cv "Red Setter". Inoltre i germogli non hanno mostrato differenze fenotipiche rispetto al controllo, indicando una buona stabilità del genotipo "Red Setter". Dalla radicazione su substrato selettivo contenente Kanamicina sono stati selezionati trasformanti Kanamicina - resistenti, rigeneratisi da eventi di trasformazione indipendenti. Dopo il trasferimento in vivo dei trasformanti Kanamicina-resistenti, le piantine (51) che hanno superato lo stress del trasferimento in vivo sono state sottoposte a screening molecolare per verificare mediante PCR, l'avvenuta introgressione del transgene. L'efficienza del protocollo per la rigenerazione e trasformazione della cv "Red Setter" è stata confermata anche dalle analisi molecolari. Lo screening molecolare della

progenie T₀, ha permesso di individuare 17 piante effettivamente transgeniche per il gene della prosistemina, mostrando l'efficienza del protocollo adottato per questa cv. L'analisi molecolare comprova che il genotipo Red Setter ha risposto bene al protocollo adottato, rivelandosi stabile nella trasmissione ed espressione del costruito genico. Dei 17 trasformanti RSYS un campione di 15 piantine T₀ è stato analizzato mediante Real Time RT-PCR indi è stato verificato il livello di espressione utilizzando i primer Pc-BBSBBFw e Pc-BBSBBRv che appaiono sugli esoni 10 ed 11 della prosistemina. I trasformanti nella T₀ mostrano diversi livelli di espressione e comunque tutti superiori al controllo in generale, raggiungendo un picco massimo di espressione nel genotipo RSYS 24, che infatti sovraesprime 95 volte più del controllo. La stessa analisi di espressione è stata effettuata sulla sub-popolazione T₁ costituita da quattro genotipi RSYS 24, 32, 38 e 54 che sono quelli più rappresentativi della popolazione, perché con il più alto livello di sovraespressione. L'analisi ha confermato che la sovraespressione si mantiene stabile da una generazione alla successiva, per cui è questo certamente un materiale elettivo da utilizzare come modello in saggi biologici per valutare il livello di resistenza indotta dal gene. Il materiale ottenuto è sempre stato osservato dal punto di vista fenotipico, ed è stato rilevato che si tratta di un genotipo tendente al dwarf, in quanto presentano un modello architetturale della pianta caratterizzato da taglia ridotta rispetto al relativo controllo non trasformato, della stessa età cioè allo stesso stadio fenologico. Il livello di resistenza è stato verificato allestendo dei saggi biologici contro afidi e contro il fungo fitopatogeno *Alternaria solani*. E' stato dunque scelto dalla subpopolazione il genotipo RSYS con la più alta espressione rispetto al controllo non trasformato, ed è stato notato che la comparsa dei sintomi necrotici sulla superficie fogliare è più lenta e più circoscritta. Analogamente nei saggi effettuati sul medesimo genotipo con gli afidi, è stato osservato che ciascuna neanide allevata sul genotipo RSYS, non è arrivata allo stadio riproduttivo ed inoltre presenta una minore longevità. Dai risultati dell'analisi del *locus* Mi utilizzando il marcatore CAPS REX-1, è stato verificato che la cv "Red Setter" ed i corrispettivi genotipi transgenici hanno il *locus* Mi in condizioni di omozigosi recessiva e quindi non hanno l'allele di resistenza a *Macrosiphum euphorbiae*, pertanto che l'esplicazione di meccanismi di resistenza ad afidi rilevati dai saggi biologici sono proprio dovuti all'azione della sistemina in queste piante transgeniche RSYS.

Il secondo approccio sperimentale ha previsto la realizzazione di incroci tra e 2 diverse linee di pomodoro e la cv BBS abbiamo cioè scelto come sistema modello per la nostra analisi, piante transgeniche di *Lycopersicon esculentum* cv "Better Boy" (BB) che sovraesprimono costitutivamente il cDNA della prosistemina sotto l'azione del promotore 35S del CaMV (piante siglate BBS) (McGurl *et al.*, 1994) e che includono nel proprio background anche il gene Mi di resistenza agli afidi (Sys+Sys+MiMi), ed il corrispondente controllo (piante siglate BB) non trasformato della stessa cv e che non include il gene Mi (Sys-Sys- mimi). Gli incroci sono stati effettuati dopo screening dei parentali a livello morfologico e citologico, onde individuare possibili poliploidi da scartare come parentali negli incroci. L'analisi citologica su piante ritenute poliploidi e/o aneuploidi su base morfologica (foglie più grandi e più spesse, fiori più grandi, colore più intenso), rispetto a quelle con fenotipo normale della corrispondente pianta non trasformata, ha confermato l'effettiva differenza tra fenotipo normale e fenotipo poliploide sulla base del numero medio di cloroplasti nelle cellule di guardia. L'analisi statistica ha verificato che le differenze nel numero medio di cloroplasti per stoma tra piante transgeniche BBS e non trasformate BB (mediamente 11 cloroplasti/stoma) sono molto significative.

Con gli incroci effettuati, finalizzati allo studio della combinazione di più geni di resistenza, si è voluto introgradire il gene Prosys nella cv BB unitamente al gene Mi di resistenza agli afidi. Sono state ottenute linee F₁ ed F₂ e linee BC₁ e si è proceduto con uno screening molecolare mediante PCR e analisi CAPS dei ricombinanti ottenuti mediante incroci. Le analisi molecolari hanno confermato che sono stati ottenuti ricombinanti dei 2 parentali BB (Sys-Sys- mimi) e BBS (Sys+Sys+ MiMi), e cioè i genotipi (Sys+ mimi) e (Sys-Sys- MiMi) rispettivamente. La strategia dell'incrocio dunque è risultata efficace per ottenere materiale vegetale da poter utilizzare in saggi biologici onde verificare la partecipazione della sistemina in risposte di difesa agli afidi in sinergismo con il gene Mi, nell'ipotesi che la presenza contemporanea dei due geni può rappresentare un'interessante strategia di difesa. Dai dati riportati si può concludere che, mediante trasformazione genetica via *Agrobacterium. Tumefaciens* della cv "Red Setter" di *Solanum lycopersicum*, è stata ottenuta una popolazione di piante sovraesprimenti la sistemina (RSYS), più del relativo controllo non trasformato (RD) con una certa variabilità tra i diversi individui, fino a raggiungere un picco di sovraespressione 95 volte superiore al controllo (RD), nel genotipo RSYS 24. L'analisi di espressione è stata ripetuta sulla progenie T₁ di una sub-popolazione della T₀ costituita dai genotipi con i più alti livelli di sovraespressione ed ha confermato che il livello di sovraespressione resta invariato nel passare da una generazione (T₀) alla successiva (T₁). Ciò è molto importante perché significa che si è riusciti a selezionare piante transgeniche che rappresentano un modello stabile di sovraespressione costitutiva della sistemina, in grado di esplicitare meccanismi di resistenza durevole a stress biotici. Questo risultato, ottenuto utilizzando come strategia l'applicazione di biotecnologie vegetali, è esaltato dai risultati dei saggi biologici contro afidi e funghi fitopatogeni. Infatti, come si può rilevare dai risultati dell'infezione con il fungo *Alternaria solani* del genotipo RSYS che sovraesprime 95 volte più del controllo, le lesioni provocate dal fungo fitopatogeno sulle foglie osservate dopo 48, 72, 96 e 168 ore dall'inoculo con il fungo fitopatogeno *Alternaria solani*, mentre nel genotipo RSYS interessa un'area fogliare di 10 mm², sul corrispondente controllo non trasformato (RD), ricoprono un'area di 160 mm². I saggi biologici contro afidi dello stesso genotipo transgenico RSYS, ha mostrato che nessuna neanide allevata su RSYS 24 è arrivata all'età riproduttiva, e la longevità raggiunge valori molto più bassi che nel corrispondente controllo non trasformato. Quindi, ciò dimostra che l'introggressione di un unico gene, la sistemina, nel genoma di piante di *Solanum lycopersicum* non solo riesce ad esprimere stabilmente meccanismi di difesa diretta ed indiretta ad insetti (Corrado et al., 2007), ma riesce anche ad esplicitare meccanismi di resistenza e di protezione polivalente a vari stress biotici. I risultati ottenuti sia relativi alla trasformazione genetica che agli incroci, sono positivi ed incoraggianti, in quanto la strategia della transgenosi ha consentito di ottenere piante resistenti ad insetti e a funghi. Quindi certamente l'approccio biotecnologico, lo studio di geni di resistenza diretta ed indiretta agli insetti, rappresenta un potente strumento di difesa di importanti agroecosistemi come il pomodoro, rispondente all'ottica del controllo integrato per uno sviluppo ecocompatibile delle produzioni.

7. BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, A.A. and Rutter, M.T., 1998.** Dynamic anti-herbivore defense in ant-plant: the Role of induced responses. *Oikos*, 83: 227-236
- Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H., Tumlinson, J.H., 1997.** An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276:945-949
- Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., De Moura, D.S., Ryan, C.A., 1999.** A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1756-1760.
- Birnboim, H.C. and Doly, J., 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7:1513-23
- Bolter, C.J., Dicke M., van Loon, J.J.A., Visser, J.H., Posthumus, M.A., 1997.** Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *J. Chem. Ecol.* 23:1003-1023.
- Caccia, R., Delledonne, M., Balestra, G.M., Varvaro, L., Soressi, G.P., 1998.** Plant-bacterial pathogen interaction modified in transgenic tomato plants expressing the GOX gene encoding glucose oxidase. *Atti XV Eucarpia General Congress- Genetic and breeding for crop quality and resistance.* (VT) 20-25 settembre 1998
- Cipollini, D., Purrington, C.B., Bergelson, J., 2003.** Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology*, 4:79-86.
- Chen, H., Wilkerson, C.G., Kuchar, J.A., Phinney, B.S., Howe, G.A., 2005.** Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102: 19237-19242
- Cooper, W.C., Jia, L., and Goggin, F.L., 2004.** Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *J. Chem. Ecol.* 30: 2527-2542
- Corrado, G., Sasso, R., Pasquariello, M., Iodice, I., Carretta, A., Cascone, P., Ariati, L., Digilio, M.C., Guerrieri, E., Rao, R., 2007.** Systemin Regulates Both Systemic and Volatile Signaling in Tomato Plants. *J. Chem. Ecol.* 33: 669-681
- De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H., 2001.** Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410 : 577-580
- Dicke, M., Sabelis, M.W., Takabayashi, J., Bruin, J., Posthumus, M.A., 1990.** Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.*, 16: 3091-3118
- Dicke, M. and van Loon, J.J.A., 2000.** Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.*, 97: 237-24

Domborowski, J.E., Pearce, G., Ryan, C.A., 1999. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C- terminal systemin domain. *PNAS* 96 :12947-12952

Doss, R.P., Oliver, J.E., Proebsting W.M., Potter, S.W., Kuy, S., Clement, S.L., Williamson, R.T., Carney, J.R., DeVilbiss, E.D., 2000. Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6218-6223.

Duffey, S.S. and Stout, M.J., 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 3-38.

Farmer, E.E., 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411: 854-856.

Felton, G.W. and Eichenseer, H., 1999. Herbivore saliva and its effects on plant defense against herbivores and pathogens. In Agrawal, A.A., Tuzun, S., Bent, E., eds. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Ecology and Agriculture.* American Phytopathology Society Press, St. Paul, pp 19–36.

Frey, M., Stettner, C., Parè, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., Gierl, A., 2000. A herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14801-14806.

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

Funk, C.J., 2001. Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva. *Arch Insect Biochem Physiol* 46: 165–174

Gatehouse, J. A., 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction *New Phytol.*, 156: 145-169.

Goggin, F.L., Shah, G., Williamson, V.M., Ullman, D.E., 2004. Development regulation of Mi-mediated aphid resistance is independent of Mi-1.2 transcript levels. *Mol Plant Microbe Interact* 17:532-6

Goggin, F.L., Jia, L., Williamson, V.M., Ullman, D.E., 2006. Heterologous expression of the Mi-1.2 gene from tomato confers resistance against nematodes but not aphids in eggplant. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 383-8

Habashy, A.A., Testa, G., Mosconi, P., Caccia, R., Mazzuccato, A., Santangelo, E., Soressi, G.P., 2004. Partenocarpy restores fruitfulness in sterile triploid (3x) tomatoes artificially obtained by crossing 4x x 2x somaclones. *Journal of horticultural Science & Biotechnology* 79: 322-328

- Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., Baldwin, I.T., 2001.** Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol* 125: 711–717
- Halkier, B.A. and Du, L.C., 1997.** The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci.*2: 425-431
- Hebert, S.L., Jia, Lingling, Goggin, F.L., 2007.** Quantitative differences in aphid and foliar symptom development on tomato plants carrying the Mi resistance gene. *Environ Entomol*, 36: 458-67
- Heil, M., Koch, T., Hilpert, A., Fiala, B., Boland, W., Linsenmair, K.E., 2001.** Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1083-1088
- Heil, M. and Baldwin, I.T., 2002.** Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Plant Science* 7: 61-67
- Heil, M. and Kost, C., 2006.** Priming of indirect defences. *Ecology Letters* 7:813-817.
- Heil, M., 2008.** Indirect defence via tritrophic interactions. *New phytologist* 178:41-61
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoot R.A., 1983.** Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180
- Karban, R., and Baldwin, I.T., 1997.** Induced response to herbivory. The University of Chicago Press, Chicago, 319 pp.
- Kessler, A. and Baldwin, I.T., 2001.** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141–2144
- Koornneef M., van Diepen, J.A.M., Hanhart C.J., Kieboom de W.A.C., Martinelli L., Schoenmakers H.C.H., Wijbrandi. 1989.** Chromosomal instability in cell and tissue cultures of tomato haploids and diploids. *Euphytica* 43:179-186, 1989
- Lawrence, P.K. and Koundal, K.R., 2002.** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *E.J.B.* 5 (1)1-17
- Li, L., Li, C., Lee, G.I., Howe, G.A., 2002.** Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6416-21
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta(T)}$ method. *Methods* 25:402-408
- Mariotti, D., 2007.** I nematodi: un problema serio per le produzioni agrarie. *Ricerca & Futuro*, 15

Martinez de Ilarduya, O., Xie, Q., Kaloshian, I., 2003. Aphid-induced defense responses in Mi-1- mediated compatible and incompatible tomato interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 16: 699-708

Mattiacci, L., Dicke, M., Posthumus, M.A., 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larve: role of mechanical damage and herbivore elicitor. *J. Chem. Ecol.* 20 : 2229-2247

Mattiacci, L., Dicke, M., Posthumus, M.A., 1995. β -Glucosidase: An elicitor of erbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2036- 2040

Mc Cormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., Fraley, R., 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L.esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report* 5:81-84

Mc Gurl, B., Pearce, G., Orozo-Cardenas, M., Ryan, C.A., 1992. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255: 1570-1573

Mc Gurl, B. and Ryan, C.A., 1992. The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol Biol.* 20: 405-409

Mc Gurl, B., Orozco-Cardenas, M., Pearce, G., Ryan, C.A., 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 9799-9802

Miles, P.W., 1999. Aphid saliva. *Biological Reviews*, 74: 41-85.

Mitöfer, A., Maitrejean, M., Boland, W., 2005. Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. *J. Plant Growth Regul.*, 23, 170–178

Narvaez-Vasquez, J. and Ryan, C.A., 2004. The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signalling. *Planta* 218: 360-9

Oerke, E.C. et al., 1995. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier, Amsterdam

Orozco- Cardenas, M., McGurl. B., Ryan, C.A., 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in Tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Plant Biology*, vol 90: 8273-8276

Paré, P.W. and Tumlinson, J.H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121 :325-331

- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A., 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898
- Pearce, G., Johnson, S., Ryan, C.A., 1993.** Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-aminoacid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J. Biol. Chem.* 268: 212-216
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann J., Ryan, c.a., 2001.** Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* 411 :817-20.
- Pearce, G., Ryan, C.A. 2003.** Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J. Biol. Chem.* 278:30044-50
- Pohnert, G., Jung, V., Haukioja, E., Lempa, K., Boland, W., 1999.** New fatty acid amides from regurgitant of lepidopteran (*Noctuidae*, *Geometridae*) caterpillars. *Tetrahedron*, 55. 11275-11280
- Pimentel D., Acquay H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, V., Giordano, S., Horowitz, A., D'Amore, M., 1993.** Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In :Pimentel. D., Lehman, H., Eds., *The pesticide question:environment, economics, ethics.*, Chapman &Hall, London, pp.85-105.
- Pokalsky., A.R., Hiatt, W.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C.M., Shewmaker, C.K., 1989.** Structure and expression of elongation factor 1 α in tomato. *Nucleic Acid Research*, 17:4661- 4673.
- Quiroz, A., Petterson, J., Pickett, J.A., Wadhams, I.J., Niemeyer, H.M., 1997.**Semiochemicals mediating specing behavior of bird-cherry-oat aphid,*Rhopalosiphum padi*, feeding on cereals. *J Chem Ecol* 23:2599-2607
- Redman A.M., Donald F., Cipollini Jr., Schultz J.C., 2001.** Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 126:380-385
- Rossi, M., Goggin, F.L., Milligan, S.B., Kaloshian, I., Ullman, D.E., 1998.** The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 9750-4
- Ryan, C.A., 2000.** The systemin defensive pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochem. Biophys. Acta* 1477: 112-121
- Ryan, C.A. and Pearce, G., 1998.** Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Ann.Rev. Cell Dev. Biol.* 14 : 1-17
- Ryan, C.A. and Pearce, G., 2003.** Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. *PNAS* vol. 100: 14577-14580

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Schettino, M., Caccia, R., Testa, G., Soressi, G.P., 1998. Piante di pomodoro transgeniche per l'inibitore di proteasi Kunitz, finalizzate al controllo dell'*Helicoverpa armigera*. Atti IV Giornate Scientifiche SOI- Sanremo (Im) 1-3 Aprile 1998

Shewmaker, C.K., Ridge N.P., Pokalsky A.R., Rose R.E., Hiatt, W.R. 1990. Nucleotide sequence of an *EF-1 alpha* genomic clone from tomato. *Nucleic Acids Res.* 18:4276

Schillmiller, A.L. and Howe, G.A., 2005. Systemic signaling in the wound response *Cur.Op. Plant Biol.* 8: 369-377

Schmelz, E.A., Alborn, H.T., Tumlinson, J.H., 2001. The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid- induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta* 214:171-179

Shaffer A., Rosenwald A., Hurt E., Giltnane J.M., Lloyd TL., Pickeral, O.K., Staudt, L., 2001. Signature of the immune response. *Immunity*, 15: 375-385

Spiteller, D., Dettner, K., Boland, W., 2000. Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators : microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biological Chemistry* 381: 75-762

Tortiglione, C., Fogliano, V., Ferracane, R., Fanti, P., Pennacchio, F., Monti, L.M., Rao, R., 2003. An insect peptide engineered into the tomato prosystemin gene is released in transgenic tobacco plants and exerts biological activity. *Plant Molecular Biology* 6:891-902.

Tremblay, E., 1999. Entomologia applicata. Liguori Editore

Truitt, C.L., Wei H.X., Parè, P.W., 2004. A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell*, 16: 523-532

Turling, T.C.J. and Benrey, B., 1998. Effects of plant metabolites on the behaviour and development of parasitic wasps. *Ecoscience* 5 : 321-333.

Walling, L.L., 2000. The Myriad Plant Responses to Herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19:195-216

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M., 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27: 581-590.

Williamson, V.M., Ho, J.Y., Wu, F.F., Miller, N., Kaloshian, I., 1994. A PCR- based marker tightly linked to nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theor. Appl. Gen.* 87: 757-76

Van Roekel, J. S.C., Damm, B., Melchers, L.S., Hoekema, A., 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Reports* 12 : 644- 647

Van Den Bulk, R.W., Löffler, H.J.M., Lindhout, W.H., Koorneef, M. 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and comparison with chem.. mutagenesis. *Theor. App. Gen.* 80:817-825.

Zangerl, A.R, 2003. Evolution of induced plant responses to herbivores. *Basic and Appl. Ecol.*, 4: 91-103.

Zhang, Z.P. and Baldwin, I.T., 1997. Transport of [2-¹⁴C] jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris* *Planta* 203, 436-441

Pubblicazioni

CASCONE, P., COPPOLA, M., SCHETTINO, M., RAO, R., 2008. Prosystemin over-expression in different tomato genetic backgrounds. *Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*
Padova, Italy – 14/17 September, 2008

*Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress
Padova, Italy – 14/17 September, 2008*

ISBN 978-88-900622-8-5

Poster Abstract – C.16

PROSYSTEMIN OVER-EXPRESSION IN DIFFERENT TOMATO GENETIC BACKGROUNDS

CASCONE P., COPPOLA M., SCHETTINO M., RAO R.

Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, University of
Naples

“Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

systemin, Solanum lycopersicum, transgenic plants

Prosystemin is the precursor of the 18 aminoacid systemin polypeptide released, as systemic signal, in response to the damage produced by phytophagous insects or mechanical wounding. Systemin is the primary signal for the signaling cascade that is released at wound site and, in cooperation with Jasmonic Acid (JA), transmits the defence signal distantly along the infested plant. The polypeptide activates a lipid-based signal transduction pathway in which the 18:3 fatty acid, linolenic acid, released from plant membranes, is converted to the oxylipin signaling molecule JA. Besides regulating the activation of over 20 defensive genes, systemin interplays with other pathways such as salt stress related participating to the cross-tolerance response. It has been recently shown that prosystemin over-expression is associated with an increased level of indirect defence through the transcriptional activation of genes involved in the production of volatile compounds and that the modifications in gene expression associate with an alteration of the volatile blend produced by transgenic plants (Corrado *et al*, *J. Chem. Ecol* 2007; 33: 669). The combination of increased levels of direct and indirect defences represent an interesting approach for tomato defence against herbivores. In order to study an example of defence gene combination, we produced tomato lines overexpressing prosystemin, in different genetic backgrounds including other resistance genes. These lines should reveal a better performance in the defence responses induced by herbivore infestations.