

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Scuola di dottorato in Scienze Agrarie ed Agro-Alimentari

Corso di dottorato in Agrobiologia e Agrochimica XXIII ciclo

Indirizzo Patologia Vegetale



Strumenti di genomica per lo studio di geni coinvolti nella resistenza a patogeni in Solanum tuberosum e Vicia faba

Anno Accademico 2010/2011

TUTOR

Prof. Astolfo Zoina

DOTTORANDA

Dott.ssa Stefania Vitale

CO-TUTOR

Prof.ssa Amalia Barone

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Matteo Lorito

INDICE

1. INTRODUZIONE GENERALE	1
1.1. Interazione pianta-patogeno.....	1
1.2. L'arsenale difensivo della pianta.....	4
1.3. Strumenti genomici per lo studio delle interazioni pianta-patogeno.....	5
1.4. Obiettivi generali	7
2. IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI IN VARIETA' DI FAVA RESISTENTI AD <i>ASCOCHYTA FABAE</i>	9
2.1. Introduzione	9
2.1.1. <i>Ascochyta fabae</i> Speg.	9
2.1.2. Caratteristiche botaniche e genetiche di <i>Vicia faba</i>	11
2.1.3. Risorse genetiche e molecolari in <i>Vicia faba</i>	13
2.1.4. Genomica nelle leguminose.....	17
2.1.5. L'utilizzo di specie modello nella genomica comparativa	18
2.1.6. Sintenia nelle leguminose	21
2.1.7. Scopo del lavoro	24
2.2. Materiali e metodi	26
2.2.1. Materiale vegetale	26
2.2.2. Analisi dei marcatori molecolari.....	27
2.2.2.1. Estrazione del DNA genomico.....	27
2.2.2.2. Marcatori SSR (Simple Sequence Repeats) di <i>Vicia faba</i>	27
2.2.2.3. Marcatori SSR (Simple Sequence Repeats) di <i>Pisum sativum</i>	28
2.2.2.4. Marcatori derivati da sequenze EST (Expressed Sequence Tags)	28
2.2.3. Analisi dei dati.	30
2.2.3.1. Costruzione della mappa genetica	30
2.2.3.2. Mappaggio dei caratteri QTL.....	31
2.3. Risultati	35
2.3.1. Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL <i>Vf6 x Vf 136</i>	35
2.3.2. Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL <i>Vf29H x Vf 136</i>	40
2.3.3. Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL <i>Vf6 x Vf 27</i>	45
2.3.4. Analisi dei QTL associati alla resistenza ad <i>Ascochyta fabae</i> nella popolazione RIL <i>Vf6 x Vf 136</i>	49
2.4. Discussione.	51
3. IDENTIFICAZIONE DI GENI ESPRESSI DURANTE L'INTERAZIONE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM-SOLANUM TUBEROSUM</i>	62
3.1. Introduzione.	62
3.1.1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	62
3.1.2. L'avvizzimento batterico della patata: meccanismo della malattia e sintomatologia	64
3.1.3. Importanza economica della malattia	69
3.1.4. Il controllo della malattia.....	69

3.1.5. La specie selvatica <i>Solanum commersonii</i>	71
3.1.6. Scopo del lavoro	72
3.2. Materiali e metodi.....	73
3.2.1. Materiale vegetale.....	73
3.2.2. Test di patogenicità <i>in vivo</i> e campionamento del materiale verde.....	74
3.2.3. Esperimento MicroArray con tecnologia CombiMatrix	74
3.2.3.1. Estrazione RNA totale.....	74
3.2.3.2. Sintesi dell'RNA antisenso	75
3.2.3.3. Disegno del chip	77
3.2.3.4. Ibridazione e analisi dell'immagine.....	78
3.2.3.5. Estrazione, normalizzazione e filtrazione dei dati	79
3.2.3.6. Analisi statistiche e bioinformatiche	79
3.2.4. Analisi RT-qPCR.....	80
3.3. Risultati	84
3.3.1. Test di resistenza al patogeno <i>Ralstonia solanacearum</i>	84
3.3.2. Analisi MicroArray del chip di pomodoro.....	85
3.3.2.1. Categorizzazione funzionale dei geni differenzialmente espressi .85	
3.3.3. Analsi MicroArray del chip di patata.....	90
3.3.3.1. Categorizzazione funzionale dei geni differenzialmente espressi .90	
3.3.3.2. Co-regolazione dei geni differenzialmente espressi	95
3.3.4. Validazione mediante RT-qPCR dei risultati.....	98
3.4. Discussione	106
4. CONCLUSIONI GENERALI.....	114
5. BIBLIOGRAFIA.....	117
6. APPENDICE.....	139

1 Introduzione generale

1.1 Interazione pianta-patogeno

Le piante sono costantemente esposte al rischio di ammalarsi. Durante milioni di anni esse ed i relativi parassiti si sono coevoluti attraverso un processo di reciproco adattamento. Durante questo processo, la pressione di selezione esercitata dai parassiti ha determinato nelle piante lo sviluppo di meccanismi di difesa (caratteri di resistenza) contro la maggior parte di essi. Solo quando un parassita riesce ad adattarsi ed a superare questi meccanismi di difesa diventa un potenziale patogeno.

Per essere patogenici, la maggior parte dei parassiti deve accedere all'interno della pianta, il che può avvenire o penetrando direttamente la superficie fogliare e radicale o indirettamente attraverso le ferite e le aperture naturali quali ad esempio stomi, idatodi, stimmi e lenticelle che la pianta normalmente utilizza per lo scambio di sostanze gassose con l'ambiente esterno. Nel caso dei funghi, ad esempio, la penetrazione può avvenire non solo indirettamente attraverso le ferite e le aperture naturali, ma anche direttamente mediante il concomitante utilizzo di strutture altamente specializzate (appressori ed ife di penetrazione) e di enzimi cutinolitici e cellulolitici. I batteri ed i virus che non dispongono, invece, di tali strutture sfruttano unicamente le aperture naturali, le ferite preesistenti o vengono inoculati da vettori animati.

Durante l'interazione tra il patogeno che penetra o che si nutre e la pianta ospite è avviato un processo di riconoscimento (Daly, 1984). Svariate componenti della pianta quali gli acidi grassi, i frammenti di parete ed alcuni composti fenolici, possono agire da molecole segnale per l'attivazione di geni importanti nella patogenesi. In modo analogo le piante ospiti a seguito dell'infezione percepiscono molecole segnale derivanti dal patogeno, quali i componenti della parete cellulare rilasciati dall'azione di enzimi idrolitici della pianta (glucanasi e chitinasi) e/o molecole prodotte dal patogeno in risposta ai segnali provenienti dalla pianta.

La percezione di un microorganismo in corrispondenza della superficie cellulare della pianta dà il via ad una risposta di difesa basale nella pianta, quando è in grado di riconoscere i *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs), molecole

del patogeno con un elevato grado di similarità strutturale tra un ampio numero di specie microbiche, che non sono normalmente presenti nell'ospite. Ad esempio, le piante sono in grado di riconoscere molteplici componenti della superficie cellulare di batteri e funghi, inclusi i lipopolisaccaridi e la flagellina dei batteri o la chitina e l'ergosterolo dei funghi (Gomez-Gomez e Boller, 2000; Nurnberger *et al.*, 2004). Questo processo anche nominato PTI (PAMP-triggered immunity) di solito blocca l'infezione prima che il patogeno infetti la pianta. Il riconoscimento delle molecole microbiche avviene in questo caso ad opera dei recettori della pianta localizzati sulla superficie cellulare, ciò induce un processo di segnalazione mediato da cascate di tipo MAP chinasi, il quale induce a sua volta l'attivazione trascrizionale di geni di risposta al patogeno, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e la deposizione di callosio per rinforzare la parete cellulare in corrispondenza del sito d'infezione. Il complesso di questi meccanismi contribuisce alla prevenzione della crescita microbica (Nurnberger *et al.*, 2004).

Una volta che le piante hanno evoluto un sistema di PTI capace di rilevare le PAMPs, alcuni patogeni hanno evoluto l'abilità di evadere tale tipo di resistenza, sopprimendo la PTI stessa. Ciò avviene o grazie alla produzione di molecole che interferiscono con il riconoscimento del patogeno in corrispondenza della membrana plasmatica o secernendo proteine effettrici nel citosol che presumibilmente alterano i meccanismi di segnalazione o di risposta coinvolti nella resistenza (figura 1.1).

I batteri Gram-negativi sfruttano un sistema di secrezione di tipo III (TTSS) evolutosi o attraverso trasferimento genico orizzontale o mediante l'adattamento dell'apparato flagellare per superare la PTI. Il TTSS infatti permette al batterio di secernere proteine effettrici direttamente nella cellula ospite, sopprimendo le risposte di difesa di tipo PAMP. Batteri patogeni come *Pseudomonas syringae* possono secernere approssimativamente dai 20 ai 30 effettori durante l'infezione. Sia gli effettori batterici che fungini alterano la fisiologia della pianta, modificando le proteine dell'ospite (attività enzimatica), inibendo le risposte di difesa, alterando l'attività trascrizionale, modulando le risposta ormonale dell'ospite (manipolazione del pathway dell'acido salicilico o jasmonico),

prevenendo le risposte di difesa strutturale (formazione di papille e deposizione di callosio) o inibendo la risposta ipersensibile (HR) (Chisholm *et al.*, 2005).

L'evoluzione da parte dei patogeni delle proteine effettrici ha in ultima istanza comportato la produzione da parte delle piante di proteine che specificamente riconoscono questi effettori batterici, fungini e virali. Questo meccanismo altamente specializzato sviluppato dalle piante prende il nome di immunità attivata dagli effettori (ETI). La ETI coinvolge il riconoscimento diretto o indiretto delle proteine microbiche utilizzate per sovvertire la PTI mediante l'utilizzo delle proteine di resistenza (R) della pianta. L'attivazione delle resistenza mediata dalle proteine R è anch'essa in grado di sopprimere la crescita microbica, ma non prima che l'invasore abbia avuto un'opportunità di proliferare limitatamente (figura 1.1). Nel corso dell'evoluzione i patogeni a loro volta hanno sviluppato o modificato i propri effettori per evitare una risposta di tipo ETI.

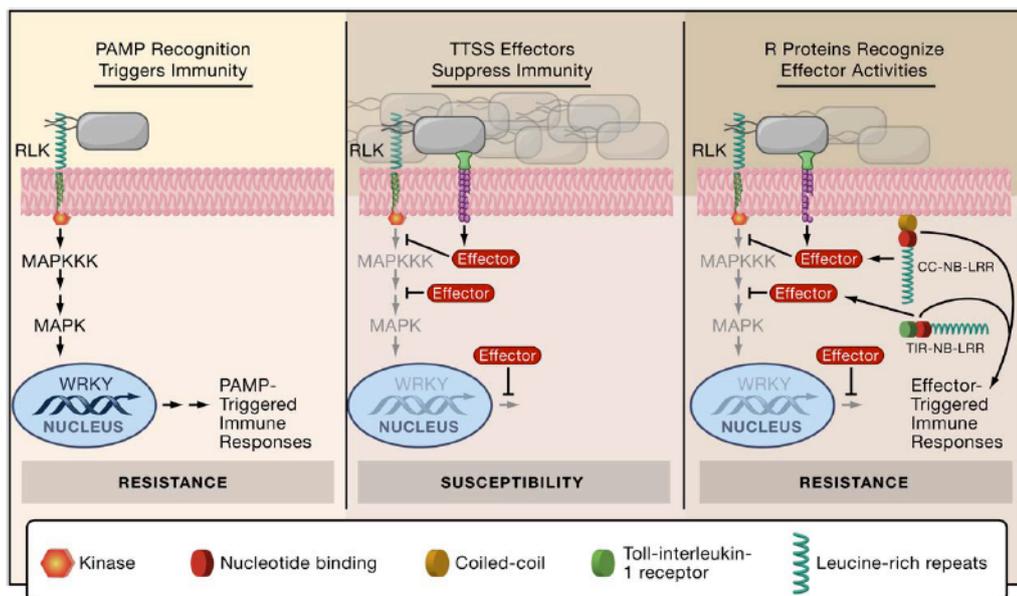


Figura 1.1. Modello dell'evoluzione della resistenza ai batteri nelle piante. A sinistra, è rappresentato il riconoscimento di PAMPs (come la flagellina batterica) da chinasi extracellulari recettore-simili (RLKs) che prontamente attivano l'immunità basale, la quale richiede la segnalazione attraverso una cascata MAP chinasi e la riprogrammazione trascrizionale mediata dai fattori di trascrizione di pianta WRKY. Al centro, i batteri patogeni usano il sistema di secrezione di tipo III per inviare proteine effettrici aventi come bersaglio molteplici proteine dell'ospite al fine di sopprimere la risposta basale immune, permettendo un significativo accumulo di batteri nell'apoplasto della pianta. A destra, le proteine di resistenza della pianta (rappresentate da CC-NB-LRR e TIR-NB-LRR) riconoscono l'attività degli effettori e ristorano la resistenza attraverso le risposte immuni attivate dagli effettori stessi. Un accumulo limitato di batteri si verifica prima di un inizio efficiente della risposta immune attivata dagli effettori (Chisholm *et al.*, 2005)

Tale meccanismo di resistenza ed il graduale processo di coevoluzione tra piante e patogeni fu spiegato da Flor (1955) con la teoria gene-per-gene, secondo la quale nell'interazione incompatibile per ciascun gene che conferisce virulenza (patogenicità) al patogeno c'è un corrispettivo gene di resistenza nella pianta ospite, che conferisce resistenza al patogeno e viceversa. In questo caso il gene di virulenza diventa un gene di "avirulenza".

Quando prende luogo l'interazione del prodotto di un gene di avirulenza con quello del corrispettivo gene di resistenza, avviene l'attivazione delle risposte di difesa. Tali risposte sono caratterizzate dal rapido flusso di calcio o di altri ioni, dall'*oxidative burst* extracellulare, dalla riprogrammazione trascrizionale nel ed intorno al sito di infezione ed in molti casi dalla morte cellulare programmata localizzata (HR) (Greenberg e Vinatzer, 2003; Nimchuck *et al.*, 2003). La somma di questi eventi porta al blocco della crescita del patogeno.

La risposta di difesa basale o PTI si sovrappone significativamente a quella mediata dalle proteine R o ETI, anche se risulta essere più lenta e di minore intensità (Belkhadir *et al.*, 2004).

1.2 L'arsenale difensivo della pianta

Le piante possiedono differenti tipi di barriere difensive utili a limitare o contrastare l'ingresso o l'espansione del patogeno. Le barriere possono essere di due tipi: passive o precostituite oppure attive o postinfettive.

Sono passive, ad esempio, la spessa cuticola cerosa ed idrofobica di foglie e frutti che fungono da barriera fisica, stomi con aperture assai esigue e dotate di estroflessioni protettive, incrostazioni ed adcrostazioni rispettivamente di lignina e suberina nelle pareti delle cellule vegetali, riserve di composti antimicrobici di varia natura, strategicamente dislocati ed idonei a prevenire la colonizzazione tissutale.

Le barriere attive o postinfettive sono attivate una volta avvenuto il contatto con il patogeno. Nella difesa attiva, si mette in moto una serie di eventi metabolici che modificano lo stato fisiologico della pianta e la rendono più pronta a far fronte agli "invasori". Le modificazioni riguardano sia il rafforzamento dei meccanismi

analoghi a quelli della difesa passiva, sia l'attuazione di risposte di altra natura inclusa la morte cellulare.

Quando le risposte di difesa attivate sono tali da bloccare il patogeno, le interazioni pianta-patogeno vengono definite incompatibili (Hutcheson, 1998); quando invece la pianta si ammala, si parla di interazioni compatibili.

La resistenza di una pianta nei confronti di un determinato patogeno può essere caratterizzata da un unico/pochi geni (resistenza mono/oligogenica, anche detta verticale), oppure da più geni (resistenza poligenica o orizzontale). Nel secondo caso ciascuno è necessario, ma non sufficiente, al conseguimento della resistenza poiché ogni gene codifica per un fattore che si comporta da carattere quantitativo. Le resistenze oligogeniche a differenza di quelle poligeniche sono molto efficaci e poco influenzabili dalle condizioni ambientali e colturali, ma sono solitamente poco durevoli essendo efficaci solo verso specifiche razze del patogeno. Tale patogeno, a causa della pressione selettiva, sarà in grado di superare più o meno rapidamente la resistenza mediante la comparsa di nuove razze fisiologiche. Tra gli esempi di resistenza poligenica vi è la “resistenza del non ospite”, resistenza espletata da tutte le piante di una specie verso i membri di una data specie di un patogeno (Heath, 1991). Essa coinvolge geni e fattori di difesa precostituiti ed indotti (Heath, 1997). Contrariamente, la “resistenza dell'ospite” viene espressa da un genotipo di una pianta appartenente ad una specie ospite normalmente suscettibile ad una particolare razza di un patogeno. Spesso è controllata da un singolo gene di resistenza (R), il cui prodotto interagisce direttamente od indirettamente con un elicitore specifico del patogeno codificato da un gene di avirulenza (Avr) (Hammond-Kosack e Jones, 1996).

1.3 Strumenti genomici per lo studio delle interazioni pianta- patogeno

Lo studio delle funzioni espletate dai prodotti genici nelle interazioni pianta-patogeno è fondamentale per la comprensione dei processi biologici e metabolici messi in atto dal patogeno e dalla pianta durante le varie fasi del processo infettivo. Queste informazioni permettono di individuare gli eventi chiave che prendono luogo durante l'infezione e la colonizzazione della pianta da parte del

patogeno nonchè i meccanismi che consentono alla pianta di superare o meno l'attacco parassitario.

L'analisi dei genomi costituisce ad oggi la base per studi successivi di genomica funzionale. L'analisi globale dell'espressione genica combinata con l'utilizzo di strumenti bioinformatici stanno notevolmente incrementando la nostra capacità di predire la funzione di geni e proteine (Lemieux *et al.*, 1998, Baldwin *et al.*, 1999, Eisen 1998). Metodi per l'analisi globale dei profili proteici e la catalogazione delle interazioni proteina-proteina (e.s. yeast two hybrid) su scala genomica sono tecnicamente più difficili, ma anche il loro utilizzo sta rapidamente aumentando. Banche genetiche di mutanti per inserzione o delezione in quasi tutti i geni saranno presto disponibili per l'analisi del fenotipo nelle specie modello quali *Arabidopsis*. Cataloghi dei geni espressi in differenti condizioni, organi o individui sono già disponibili per diverse specie vegetali. Anche se l'analisi globale dell'espressione genica in pianta è in fase primordiale i costi sempre più contenuti delle tecniche di sequenziamento (e.s. RNAseq) e genotipizzazione ne stanno permettendo un maggiore uso nel mondo scientifico.

Negli ultimi anni sono stati, infatti, numerosi i progetti di sequenziamento di genomi di organismi fitopatogeni e delle relative piante ospiti. Alcuni esempi sono costituiti dagli organismi patogeni quali *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *Fusarium oxysporum* [*Fusarium* Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>)], *P. silyngae* (Buel *et al.*, 2003), e da piante quali *Solanum tuberosum* (http://solgenomics.net/organism/Solanum_tuberosum/genome), *Solanum lycopersicum* (http://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome), *Arabidopsis thaliana* (Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* Nature 408: 796-815).

L'insieme di queste tecnologie potrà fornire informazioni utili sui geni differenzialmente espressi durante l'interazione compatibile e incompatibile pianta-patogeno o delucidare il ruolo di specifiche molecole segnale (e.s. effettori del patogeno, geni di resistenza o recettori della pianta) durante il processo infettivo. Infatti, sebbene alcune molecole segnale siano state isolate e

caratterizzate, molti meccanismi di percezione e trasduzione del segnale nella pianta rimangono ancora largamente sconosciuti.

Inoltre la genotipizzazione su larga scala faciliterà l'analisi genetica di popolazioni che siano abbastanza grandi da permettere un mappaggio accurato di QTL di resistenza eliminando la componente di resistenza legata ai fattori ambientali. L'integrazione delle informazioni relative alla posizione dei QTL, alla sequenza genomica e alle varianti alleliche provvederà le basi per approcci basati su geni candidati per clonare i QTL di resistenza. Alcuni approcci potenziali sono costituiti dal silenziamento genico o la sovraespressione genica mediata da virus e dall'utilizzo di librerie di knock-out geni (Baulcombe 1999, Kumagai *et al.*, 1998, Marteinssen 1998).

Le conoscenze così ottenute possono avere un'applicazione pratica per il controllo di numerose patologie vegetali mediante ad esempio l'ottenimento di piante transgeniche esprimenti geni di resistenza, introgressione di caratteri di resistenza da specie vegetali selvatiche a specie coltivate o l'isolamento di molecole naturali attive contro i patogeni (bioagrofarmaci) nell'ottica di un'agricoltura sempre più volta alla sostenibilità economica ed ambientale.

1.4 Obiettivi generali

Nella presente tesi di dottorato vengono analizzati due differenti patosistemi *R. solanacearum/Solanum tuberosum* e *Ascochyta fabae/Vicia faba*.

Le due tematiche sono state affrontate con metodologie differenti; nel primo caso è stato effettuato uno studio del profilo di trascrizione dei geni espressi durante il processo infettivo al fine di individuare i geni implicati nel meccanismo di resistenza/suscettibilità.

Nel secondo caso, invece, si è realizzata la fase preliminare di un lavoro di miglioramento genetico avanzato, finalizzato ad individuare marcatori associati a QTL di resistenza ad *A. fabae*, da poter utilizzare in futuri progetti di MAS (marker-assisted selection). A tale scopo sono state saturate, con marcatori molecolari ortologi sviluppati in altre leguminose, mappe genetiche preesistenti di tre differenti popolazioni RIL F₆ di *V. faba* in cui uno dei parentali mostrava un differente livello di resistenza nei confronti del patogeno *A. fabae*.

Fine comune di entrambi gli studi è quello di fornire alla comunità scientifica le conoscenze ottenute per il controllo di entrambi i patogeni.

2 Identificazione di marcatori molecolari in varietà di fava resistenti ad *Ascochyta fabae*

2.1 Introduzione

2.1.1 Ascochyta fabae Speg.

Ascochyta fabae, agente causale dell'antracnosi della fava, è il responsabile di una delle malattie fungine più frequenti nelle zone di produzione della fava. Tale malattia è stata osservata in molte regioni del mondo (Gaunt, 1983) e può determinare perdite di produzione che variano dal 30 al 40%, fino a raggiungere il 90% in presenza di cultivar con un elevato grado di suscettibilità e di condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo della malattia.

I sintomi della malattia si manifestano su foglie, steli e baccelli. Nelle foglie si produce inizialmente una lesione circolare di colore nero-marrone che presenta una lieve depressione. Con il progredire della malattia la lesione si converte in un'area necrotica. L'unione di varie aree necrotiche può coprire gran parte dell'area fogliare e ridurre sensibilmente l'area fotosintetica della pianta.

Sugli steli le lesioni sono più allungate e profonde di quelle prodotte sulle foglie. In alcuni casi le aree necrotiche possono coprire tutto lo stelo fino a produrne la rottura. Sui baccelli le lesioni sono molto profonde e di forma circolare, chiare al centro e scure ai lati. Il micelio del fungo può in alcuni casi crescere fino all'interno del baccello contaminando i semi o inducendone l'aborto (figure 2.1 A e B).

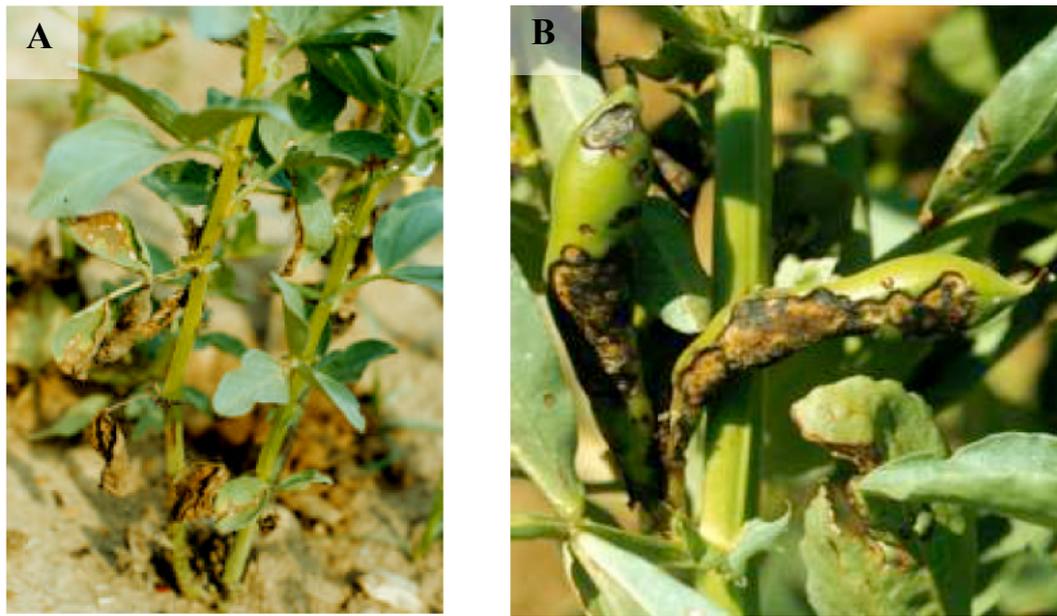


Figura 2.1. (A) Sintomi dell'antracnosi della fava su steli e foglie; (B) Sintomi dell'antracnosi della fava su baccelli.

A. fabae è un fungo eterotallico ed ha bisogno di due ceppi di complementazione differenti (MAT-1 e MAT-2) per poter completare il proprio ciclo sessuale e formare pseudotecie fertili necessari per lo sviluppo del suo teleomorfo *Didymella fabae* (Kaiser, 1997). Le ascospore così prodotte possono essere disperse dal vento raggiungendo grandi distanze e costituendo una nuova fonte di inoculo. Inoltre, essendo queste il frutto di una riproduzione sessuale e quindi di una ricombinazione genetica, è maggiore la possibilità che in esse si siano modificati i geni di virulenza e che quindi siano caratterizzate da un più alto grado di patogenicità.

Sono state identificate sette razze del patogeno, virulente contro distinti genotipi di fava (Hanounik e Robertson, 1989; Rashid *et al.*, 1991b; Kharrat *et al.*, 1997; Kohpina *et al.*, 1999).

Molte sono le fonti di resistenza ad *Ascochyta* identificate in fava ed utilizzate in programmi di miglioramento genetico (Bond e Pope 1980; Hanounik e Robertson 1989; Raishid *et al.*, 1991a, 1991b; Ondrej, 1993; Sillero *et al.*, 2001). Nonostante ciò, le conoscenze acquisite sulla base genetica del meccanismo di resistenza sono ancora scarse.

Geni di resistenza ad *Ascochyta* sono stati riportati in pisello (Tar'an *et al.*, 2003; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2004), lenticchia (Nguyen *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003; Rubeena *et al.*, 2006) e cece (Santra *et al.*, 2000; Collard *et al.*, 2003; Flandez-Galvez *et al.*, 2003; Iruela *et al.*, 2006; Lichtenzveig *et al.*, 2006). Nel caso di *V. faba* sono stati identificati QTL di resistenza ad *A. fabae* in differenti popolazioni F₂ provenienti dall'incrocio intra-specifico tra le linee *Vf6* e *Vf136* e le linee *29H* e *Vf136* (Román *et al.*, 2003; Avila *et al.*, 2004). Nel primo studio Román e collaboratori (2003) hanno riportato l'esistenza di due QTL, ascritti ai cromosomi 2 e 3 dell'incrocio *Vf6* x *Vf136* e confermati da studi successivi anche nelle popolazioni F₆ dello stesso incrocio (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). Nel lavoro di Avila e collaboratori (2004) è stata studiata la resistenza su foglie e steli usando due differenti ceppi di *Ascochyta*. In questo modo sono stati individuati 6 QTL di resistenza ad *A. fabae* nella mappa genetica derivante dall'incrocio *29H* x *Vf136*, dove *29H* è il parentale resistente.

Nonostante esistano mezzi chimici e pratiche agronomiche *ad hoc* per evitare il diffondersi di tale patologia, la ricerca di varietà resistenti ed il miglioramento genetico classico rappresentano i mezzi migliori per il controllo di tale malattia se si considera la necessità di operare in condizioni di sostenibilità ambientale ed economica.

2.1.2 Caratteristiche botaniche e genetiche di *Vicia faba*

V. faba è una specie parzialmente allogama che presenta un livello di impollinazione incrociata che varia dal 4 all' 84% (Bond e Pulsen, 1983). La sua diversità intraspecifica è principalmente descritta sulla base delle dimensioni dei semi. Cubero (1974) analizzando questo carattere ha identificato quattro distinti gruppi botanici:

- *major*- con seme di dimensione grande e piatto (100 g /100 semi);
- *equina*- con seme di dimensione intermedia (60-100g/100 semi);
- *minor*- con seme di dimensione piccola e tondeggiante (< 60g/100 semi);
- *paucijuga*- con seme e pianta piccola, elevato grado di autofertilità.

Forma un gruppo botanico interessante per le sue caratteristiche ancestrali.

L'antenato selvatico della fava non è noto, e *Vicia narbonensis* è considerato il parente più prossimo a *V. faba* (Zohary e Hopf, 1973). Recentemente, Van den Ven e collaboratori (1993), mediante l'utilizzo di marcatori molecolari (RFLP), hanno collocato anche *Vicia peregrina* e *Vicia michauxii* nelle dirette vicinanze tassonomiche di *V. faba*.

V. faba è una delle piante maggiormente caratterizzate da un punto di vista citogenetico. Il suo corredo cromosomico aploide, composto da sei cromosomi, può contenere fino a circa 13 pg (picogrammi) di DNA, che corrispondono a circa 13000 Mbp (coppie di megabasi). Il primo cromosoma è molto grande (circa 18 micron di lunghezza), è metacentrico e contiene un satellite e si è probabilmente originato dalla fusione di due cromosomi telocentrici. Ci sono poi cinque cromosomi simili (lunghezza circa 7-9 micron) acrocentrici (figura 2.2).

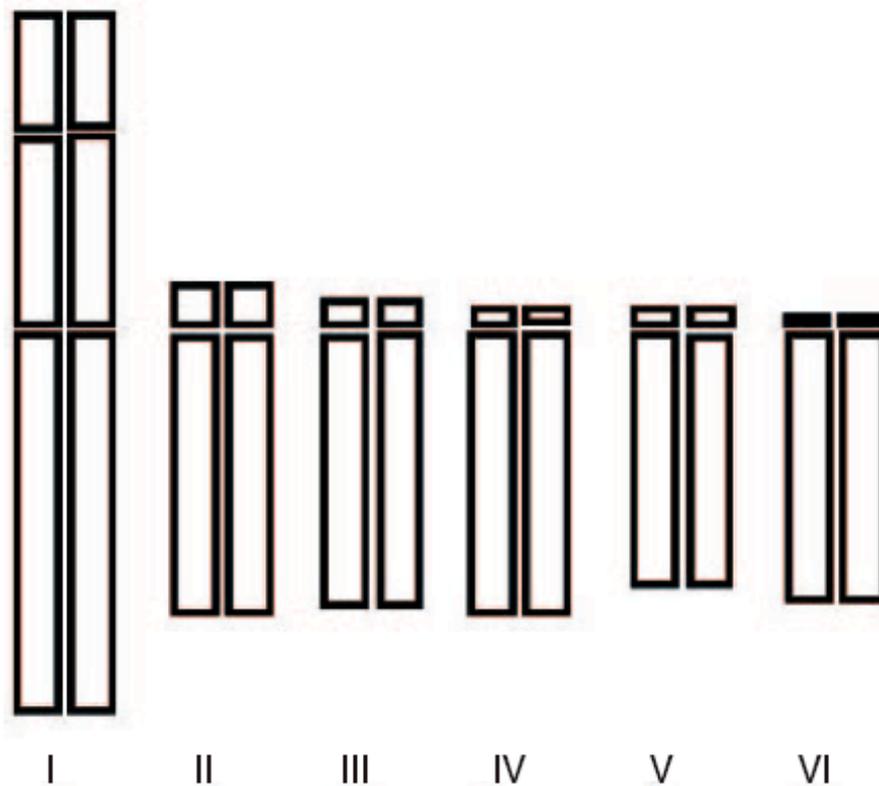


Figura 2.2. Cariogramma di *Vicia faba* (Link *et al.*, 2009).

Molti fenomeni citogenetici sono stati osservati per la prima volta attraverso lo studio di *V. faba*, per esempio, la formazione del nucleolo durante la telofase, o

l'esistenza di un limite superiore di tolleranza per la lunghezza del braccio cromosomico (Schubert e Oud, 1997; Fuchs *et al.*, 1998).

2.1.3 Risorse genetiche e molecolari in *Vicia faba*

Tra le leguminose *V. faba* possiede uno dei genomi più grandi (1C=13.33pg=13.000Mbp) (Bennet e Smith 1976; Johnston *et al.*; 1999) (tabella 2.1). Ciò ha reso enormemente difficile lo sviluppo di mappe di linkage, la localizzazione e l'identificazione di geni d'interesse e lo sviluppo di marcatori molecolari.

Tabella 2.1. Numero cromosomico e grandezza del genoma in specie di leguminose modello e coltivate.

Tribù	Genere	Specie	N° cromosomico	Dimensione genoma (Mbp/1C)	Modo di riproduzione
Trifolieae	<i>Medicago</i>	<i>M. truncatula</i>	2n=2x=16	466	Autogamia
		<i>M. sativa</i>	2n=4x=32	1,715	Allogamia
	<i>Trifolium</i>	<i>T.pratense</i>	2n=2x=14	637	Allogamia
		<i>T. repens</i>	2n=4x=32	956	Allogamia
Viciae	<i>Melilotus</i>	<i>M. officinalis</i>	2n=2x=16	1,103	Allogamia
	<i>Pisum</i>	<i>P. sativum</i>	2n=2x=14	4,337	Autogamia
	<i>Vicia</i>	<i>V. faba</i>	2n=2x=12	13,059	Autogamia
	<i>Lens</i>	<i>L. culinaris</i>	2n=2x=14	4,116	Autogamia
Cicereae	<i>Cicer</i>	<i>C. arietinum</i>	2n=2x=16	931	Autogamia
		<i>C. reticulatum</i>	2n=2x=16	931	Autogamia
Loteae	<i>Lotus</i>	<i>L. japonicus</i>	2n=2x=16	466	Autogamia
		<i>P. vulgaris</i>	2n=2x=22	588	Autogamia
Phaseoleae	<i>Phaseolus</i>	<i>V. radiata</i>	2n=2x=22	515	Autogamia
		<i>G. max</i>	2n=4x=40	1103	Autogamia

Il primo studio di identificazione di gruppi di linkage in fava fu realizzato da Sirks (1931), che trovò 19 fattori genetici che formavano quattro gruppi di linkage. In seguito, si svilupparono marcatori isoenzimatici (Mancini *et al.*, 1989; Poligano e Sonante, 1992), alcuni dei quali facilitarono la stima del tasso di allogamia in questa specie (Suso e Moreno, 1982; Peat e Adham, 1984; Suso e Moreno, 1986; Carre *et al.*, 1993; Suso *et al.*, 1993), e lo sviluppo di studi evolutivi e tassonomici (Ladizinsky, 1975; Yamamoto, 1975 e 1979; Yamamoto e Pitmann, 1980).

Negli anni '70 ed '80 furono sviluppate le prime mappe genetiche, sfruttando l'utilizzo di marcatori molecolari a DNA (tabella 2.2) e linee di traslocazione o trisomiche, che resero possibile l'associazione di caratteri o gruppi di linkage a specifici cromosomi (Sjodin, 1971a; Cabrera e Martin, 1989a; Cabrera *et al.*, 1989b). Nella tabella 2.3 sono indicati i geni che codificano per caratteri morfologici ed isoenzimatici spesso impiegati come punto di partenza per assegnare gruppi di linkage a specifici cromosomi di *V. faba*.

Negli anni '90 Van de Ven *et al.* (1991) svilupparono una mappa genetica della specie ricorrendo all'uso contemporaneo di marcatori morfologici, isoenzimatici, RFLP e RAPD. I dati di segregazione permisero di associare 17 marcatori a 7 gruppi di linkage.

In studi successivi furono descritti 11 gruppi di linkage formati da marcatori isoenzimatici, RFLP, RAPD e proteine di riserva (Torres *et al.*, 1993b, 1995, 1998; Ramsay *et al.*, 1995; Satovic *et al.*, 1996). Vaz Patto e collaboratori, (1999), Roman e collaboratori (2002; 2004) e Avila e collaboratori (2003; 2004) svilupparono nuove mappe genetiche nelle quali furono individuati, rispettivamente, i primi geni o QTL che controllavano il peso del seme e di altre caratteristiche di interesse come la resistenza a patogeni quali *A. fabae* Speg. e *Orobanche crenata*.

Attualmente è sempre maggiore il numero di marcatori molecolari basati sulla tecnica della PCR ad essere inclusi nelle mappe genetiche di fava, anche grazie allo sviluppo di marcatori in specie modello di riferimento. Mediante l'uso di marcatori ortologhi è stato infatti possibile realizzare i primi studi di sintenia in fava. In particolare, è stata realizzata la prima mappa genetica basata esclusivamente su geni funzionali, che include 151 marcatori derivati da EST ricavati dalla specie modello *M. truncatula*, da soia (*Glycyne max*) e lupino (*Lupinus albus*) (Ellwood *et al.*, 2008). Tale mappa è stata impiegata per determinare la macrosintenia tra *V. faba*, *M. truncatula* e *Lens culinaris*.

Tabella 2. 3. Localizzazione cromosomica di geni che codificano per caratteri morfologici ed isoenzimatici in *Vicia faba*

	Carattere		Gene	Cromosoma	Referenza
Morfologico	Unifogliata		<i>una</i>	5	Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	acrescimento determinato		<i>ti</i>	5	ICARDA, 1986; Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	internodi corti		<i>dw</i>	1	González, 1985; Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	distribuzione solida della pigmentazione del fiore		<i>sdp</i>	1	González, 1985; Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	Pigmento giallo del fiore		<i>yf</i>	5	González, 1985; Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	Colore del filo		<i>nb</i>		Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	Colore rosso della testa		<i>r</i>	4	Cabrera <i>et al.</i> , 1989a; Satovic <i>et al.</i> , 1996
	Colore oscuro della testa		<i>Sc</i>	2	Sjödin, 1971b; Vaz Patto <i>et al.</i> , 1999
	Aspartato aminotranferasi		<i>Aat-2</i>	3	Torres <i>et al.</i> , 1995, 1998
	Aconitasi		<i>Aco-2</i>	1	Torres <i>et al.</i> , 1995, 1998; Román 2000
Fosfatasi acida		<i>Acp-2</i>	1	Torres <i>et al.</i> , 1995, 1998	
Alcoli deidrogenasi		<i>Adh-2</i>	2	Torres <i>et al.</i> , 1995; Vaz Patto <i>et al.</i> , 1999	
Esterasi		<i>Est-1c</i>	3	Torres <i>et al.</i> , 1995	
		<i>Est-2</i>	3	Torres <i>et al.</i> , 1995	
Fruttosiochinasi		<i>Flk-2</i>	4	Torres <i>et al.</i> , 1995	
Glucoso-6-fosfato isomerasi		<i>Gpi-2d</i>	2	Torres <i>et al.</i> , 1998	
Leucina aminopeptidasi		<i>Lap-1</i>	2	Torres <i>et al.</i> , 1995	
Beta-N-acetil glucosaminidasi		<i>Nage</i>	6	Torres <i>et al.</i> , 1995, 1998	
6-fosfato deidrogenasi		<i>Pgd-p</i>	6	Torres <i>et al.</i> , 1995, 1998	
		<i>Pgd-cf</i>	5	Torres <i>et al.</i> , 1995	
Peroxidasi		<i>Ppx-1</i>	1	Torres <i>et al.</i> , 1995	
		<i>Ppx-3</i>	1	Torres <i>et al.</i> , 1998	
		<i>Ppx-4</i>	1	Torres <i>et al.</i> , 1995 (referida como <i>Ppx-3</i>)	
Superossido dimutasi		<i>Sod-1</i>	6	Torres <i>et al.</i> , 1995	

2.1.4 Genomica nelle leguminose

Nel corso degli ultimi anni c'è stato un grosso sviluppo di attività sperimentali volte a studiare le caratteristiche dei genomi appartenenti a diversi organismi. Tali studi sono alla base di quella che viene definita genomica strutturale ed i cui obiettivi sono principalmente quelli di comprendere e individuare:

- l'esatta sequenza dei genomi;
- l'organizzazione dei genomi;
- la presenza di geni e la loro organizzazione;
- la presenza di famiglie geniche.

La genomica funzionale studia, invece, i meccanismi implicati nella regolazione genica nonché la funzione dei geni stessi nei diversi stadi di sviluppo di un organismo ed in diverse condizioni ambientali.

L'elevato numero di leguminose conosciute (più di 200) e le caratteristiche genomiche di alcune di esse hanno impedito l'ottenimento di un'immagine del loro genoma univoca e soddisfacente sia a livello strutturale che funzionale. Il genoma delle leguminose è difatti dotato di grande variabilità al livello di dimensioni, numero di cromosomi, plodia e presenza di DNA ripetitivo (tabella 2.1).

In particolare, *V. faba* possiede un genoma circa dieci volte più grande di quello della soia. La dimensione dei cromosomi e il contenuto di DNA nucleare è quasi raddoppiato rispetto a quello di altre leguminose (Chooi, 1971; Lawes *et al.*, 1983; Raina e Ogihara, 1995). La quantità di DNA nucleare è infatti nell'ordine dei 30 picogrammi (pg) ed il cromosoma metacentrico da solo contiene più DNA di quello presente nel completo corredo cromosomico di *Vicia monantha* (Rees e Narayan, 1989). In aggiunta, alcune stime considerano che la dimensione del suo DNA plastidiale sia di circa 123 Kbp (Ko *et al.*, 1987; Raina e Ogihara, 1995).

A causa della grande dimensione del suo genoma, lo sviluppo delle risorse molecolari in *V. faba* è stato anche ostacolato da altre caratteristiche quali l'abbondanza di DNA ripetitivo, la recalcitranza alla trasformazione genetica e la mancanza di marcatori molecolari robusti (Choi *et al.*, 2006). Per tali motivi gli studi genomici nelle leguminose si sono focalizzati su due specie modello *M. truncatula* e *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, che sono state oggetto di ricerca

in diversi progetti genomici multinazionali che hanno dato il via a studi comparativi con altre leguminose. Tali studi rendono possibile la comprensione delle dinamiche evolutive occorse tra diverse specie e di misurare il grado di sintenia, ovvero il grado di conservazione dei geni e della loro organizzazione in *cluster*.

La genomica comparativa facilita l'importazione delle risorse genetiche sviluppate in specie modello ad altre ad esse correlate, riducendo così i costi ed incrementando l'efficienza della ricerca genetica (Phan *et al.*, 2006). Studi precedenti hanno dimostrato la validità di questo approccio scientifico nei cereali (Bennetzen, 2000; Devos e Gale, 2000; Dwivedi *et al.*, 2007; 2008), nelle crucifere (Lagercrantz *et al.*, 1996) ed in alcune leguminose (Choi *et al.*, 2004b; Kaló *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Ellwood *et al.*, 2008). Numerosi marcatori derivati da sequenze EST di *M. truncatula* e *Pisum sativum* sono stati analizzati in due popolazioni di fava, dando vita così ai primi studi di genomica comparativa nella specie (Gutiérrez, 2007).

2.1.5 *L'utilizzo di specie modello nella genomica comparativa*

L'utilizzo di specie modello presenta i seguenti vantaggi: facile conservazione e manipolazione in laboratorio, ciclo vitale breve, abbondante produzione di semi, variabilità fenotipica e genotipica, fenotipi facili da osservare e misurare, e disponibilità di metodologie di studio *ad hoc*. *M. truncatula* e *L. japonicus* oltre a presentare le suddette caratteristiche posseggono un genoma di piccole dimensioni (466 Mbp), ed un corredo cromosomico diploide ($2n = 2x = 16$) (Zhu *et al.*, 2005).

Le mappe comparative hanno dimostrato che l'organizzazione dei geni nei genomi è rimasta molto conservata durante l'evoluzione delle specie vegetali. Esiste una stretta relazione di colinearità tra i genomi di quasi tutte le graminacee coltivate e le solanacee. Tale relazione è conservata anche tra le brassicacee coltivate e *Arabidopsis thaliana* e tra le rosacee e varie leguminose (Echenique *et al.*, 2004).

Gli studi di genomica comparativa richiedono l'utilizzo di specie ponte o modello come punto di riferimento per stabilire i processi e le dinamiche evolutive che hanno portato alla speciazione. I primi studi di genomica comparativa sono stati

effettuati nei cereali dove si osservò un'ampia conservazione sia a livello di micro- che di macro-sintenia (Bennetzen, 2000; Devos e Gale, 2000). Alcune eccezioni furono però individuate e spesso riguardavano riarrangiamenti genici locali dovuti a inversioni, duplicazioni, traslocazioni e inserzioni-delezioni geniche (Zhu *et al.*, 2005).

La famiglia delle leguminose è botanicamente suddivisa in tre subfamiglie: *Caesalpinieae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*. Le leguminose da granella più importanti, come si mostra nella figura 2.3, appartengono alla subfamiglia delle *Papilionoideae* (Doyle e Luckow, 2003; Wojciechowski *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2005; Lavin *et al.*, 2005) e le relazioni filogenetiche tra le specie ad essa appartenenti sono state corroborate attraverso lo studio delle specie del phylum *Galegoide* (tribù *Viceae*, *Trifolieae* e *Cicereae*), come *Medicago* spp. e *P. sativum* (Kaló *et al.*, 2004) o del phylum *Phaseoloide* come il fagiolino e la soia (Lee *et al.*, 2001). Il livello di sintenia tra le leguminose del phylum *Galegoide* e *Phaseoloide* è risultato ridotto e limitato a piccoli intervalli genetici (Choi *et al.*, 2004b; Zhu *et al.*, 2005).

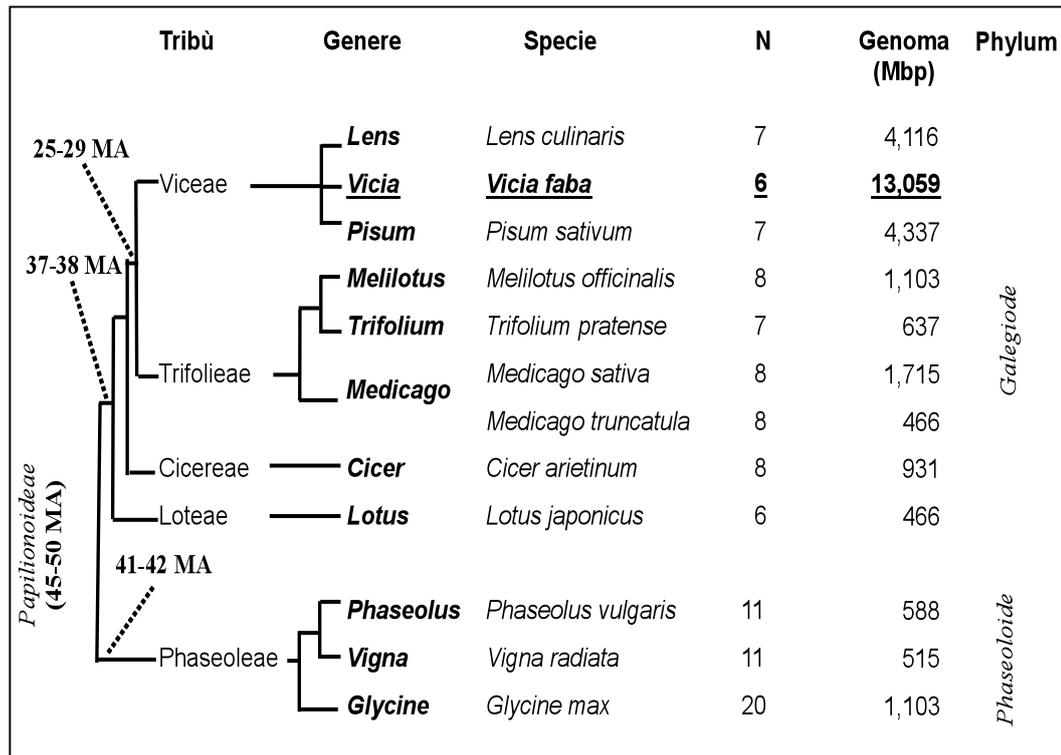


Figura 2.3. Schema filogenetico delle leguminose più importanti. A destra delle specie è indicato il numero cromosomico (N) e la dimensione del genoma espresso in Mbp, MA = Millione di anni (Choi *et al.*, 2004).

La distanza tassonomica che separa i due *phyla* giustifica lo sviluppo di un sistema di riferimento per ciascuno di essi (Doyle e Luckow, 2003; Wojciechowski *et al.*, 2004; Lavin *et al.*, 2005). Infatti, *M. truncatula* e *L. japonicus* sono state considerate specie modello per i membri del *phylum Galegoide* (Zhu *et al.*, 2005), mentre *Phaseolus vulgaris* e *G. max* per quelli appartenenti al *phylum Phaseoloide*, in quanto *P. vulgaris* presenta un genoma diploide più piccolo e più facile da maneggiare rispetto a quello della soia (Broughton *et al.*, 2003). Per alcuni anni anche *P. sativum* è stata utilizzata come specie modello per il *phylum Galegoide*, ma la scarsità di risorse genetiche e molecolari ha fatto sì che gli studi comparativi abbiano preso come riferimento altre specie (Hecht *et al.*, 2005).

Lo sviluppo di strumenti genomici in specie modello rappresenta una sfida per la genomica comparativa, il trasferimento delle informazioni e lo sviluppo di studi di sintenia su grande scala nelle leguminose (Gepts *et al.*, 2005). La scoperta di

marcatori orologi mappati in specie distanti filogeneticamente può aiutare a identificare segmenti cromosomici omologhi e quindi a facilitare l'identificazione di marcatori strettamente associati a caratteri di interesse per eventuali applicazioni di ingegneria genetica.

2.1.6 Sintenia nelle leguminose

Con il termine sintenia (o colinearità dell'organizzazione genomica) si intende la successione di marcatori molecolari di DNA (EST, SSR, etc.) che nel confronto tra mappe genetiche appartenenti a differenti specie presentano lo stesso ordine. La sintenia può essere osservata a livello macro- e micro-sintenico. La macrosintenia si riferisce alla conservazione dell'ordine dei geni tra diverse specie mediante mappaggio comparativo di marcatori comuni. Ciò può verificarsi anche a livello di sequenza dove possono incontrarsi regioni di alta omologia. Il termine di microsintenia descrive, invece, la conservazione del contenuto e dell'ordine dei geni a livello di sequenza, ciò che fisicamente viene chiamato "contig", o gruppo di cloni che presentano regioni contigue e parzialmente sovrapposte in un genoma.

Weeden *et al.* (1992) realizzarono i primi studi di sintenia a livello macrosintenico nelle leguminose, utilizzando marcatori RFLP comuni alla lenticchia ed al pisello osservando la conservazione dell'ordine dei geni. Menancio-Hautea *et al.* (1993) dimostrarono che tra *V. radiata* e *V. unguiculata* esiste un alto grado di conservazione ma che erano presenti riarrangiamenti cromosomici che separavano le due specie.

La realizzazione della mappa comparativa tra i differenti generi del *phylum Phaseoloides* (*V. radiata*, *P. vulgaris* e *G. max*) indicò che i gruppi di linkage tra *V. radiata* e *P. vulgaris* erano molto conservati, ma che la sintenia con *G. max* si limitava a corti blocchi di linkage (Boutin *et al.*, 1995). Successivamente Lee e collaboratori (2001), usando come specie modello *Arabidopsis*, riportarono livelli di conservazione maggiore tra i segmenti cromosomici di *G. max*, *P. vulgaris* e *V. radiata* rispetto a quanto dimostrato dagli studi precedenti (Boutin *et al.*, 1995). Brauner *et al.* (2002) svilupparono marcatori derivati da geni di pisello e dimostrarono che i due terzi di tali marcatori amplificavano sequenze orologhe in lenticchia. Il primo studio esaustivo di macrosintenia nelle leguminose, basato

sull'amplificazione interspecifica di marcatori derivati da sequenze EST, fu realizzato da Choi *et al.* (2004a, b) usando *M. truncatula* come specie modello. Marcatori ortologi furono mappati in *M. sativa*, *P. sativum*, *V. radiata* e *C. arietinum*. Con questo studio si ottenne la prima rappresentazione globale del grado di sintenia esistente nelle leguminose attraverso la simulazione di una mappa comparativa semplificata di sei specie, simile a quella presentata da Gale e Devos (1998), per riso ed altre graminacee. I risultati dimostrarono che il grado di sintenia delle specie all'interno dei *phyla Galegoide* e *Phaseoloide* era abbastanza elevato e che esso diminuiva quando si confrontavano specie appartenenti a questi due differenti *phylum*, nonostante si osservasse un certo grado di conservazione. Zhu e collaboratori (2005) modificarono tale mappa ed aumentarono il numero di specie studiate a otto (figura 2.4).

La mappa comparativa ottenuta offre un'idea semplificata della colinearità esistente tra le mappe di differenti leguminose. Da questo studio si evidenzia che i genomi di *M. truncatula* e *M. sativa* presentano una sintenia quasi perfetta. Anche i genomi di *M. truncatula* e *L. japonicus* mostrarono un elevato grado di sintenia interrotto sporadicamente da riarrangiamenti cromosomici, il che si riflette nel differente numero di cromosomi tra le due specie. *P. sativum* nonostante abbia un genoma dieci volte più grande di quello di *M. truncatula* ed un cromosoma in meno, mostra un'elevata sintenia con questa specie modello tenendo in considerazione gli evidenti riarrangiamenti cromosomici occorsi durante il processo evolutivo (Choi *et al.*, 2004b).

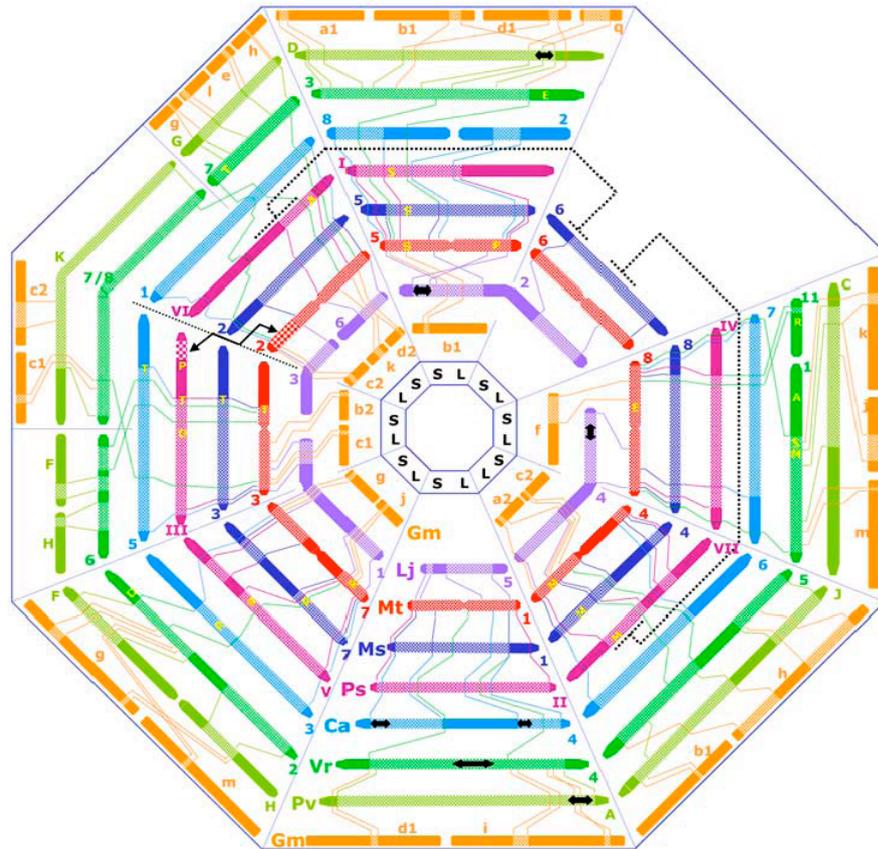


Figura.2.4. Mappa comparativa semplificata di otto leguminose. **Mt**, *M. truncatula*; **Ms**, *M. sativa*; **Lj**, *L. japonicus*; **Ps**, *P. sativum*; **Ca**, *C. Arinetum*; **Vr**, *V. radiata*; **Pv**, *Phaseolus vulgaris*; **Gm**, *G. max*. S e L rappresentano il braccio corto e lungo di ogni cromosoma di *M. truncatula*. I blocchi sintenici sono disegnati in scala basandosi sulla distanza genetica. (Zhu *et al.*, 2005).

Lo studio della sintenia tra *M. truncatula* e le leguminose appartenenti al phylum *Phaseoloide* risulta più complicato e meno informativo. La sintenia si limita a piccoli intervalli nelle leguminose più distanti filogeneticamente, il che dimostra che esiste una relazione tra la frequenza di riarrangiamenti cromosomici e la distanza evolutiva (Aubert *et al.*, 2006), che si riflette anche nelle differenze del numero cromosomico esistente tra le specie appartenenti al phylum *Phaseoloide* ed al phylum *Galegoide*.

Numerosi studi di genomica comparativa sono stati recentemente effettuati confrontando i genomi di *M. truncatula*, e *L. japonicus* con differenti specie di interesse (Zhu *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004a, b; Kaló *et al.*, 2004; Stracke *et al.*, 2004; Mudge *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2006; Cannon *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2007b; Gutiérrez *et al.*, 2007; Ellwood *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda gli studi di microsintenia, le analisi di sequenze interspecifiche sono state effettuate solo su un numero limitato di regioni genomiche. Per questo motivo le conclusioni ottenute non hanno carattere globale, dato che la struttura del genoma è altamente dinamica ed il livello di conservazione varia a seconda della parte del genoma presa in considerazione. I primi studi di microsintenia, realizzati tra *M. truncatula*, *L. japonicus* e colture con elevato interesse agronomico come erba medica e pisello (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002) permisero la clonazione in queste ultime di geni relazionati con la simbiosi.

Yan e collaboratori (2003) stimarono il livello di microsintenia tra *M. truncatula* e *G. max* ibridando l'intero genoma con diversi "contig". Più del 50% dei contig mostrò microsintenia tra le due specie. Cannon e collaboratori (2003), comparando sequenze di regioni geniche tra *M. truncatula* e *G. max*, mostrarono la conservazione dell'ordine di almeno 6 geni in comune tra di esse. La comparazione tra i genomi di *M. truncatula* e *L. japonicus* ha mostrato che i due genomi presentano approssimativamente un 82% di geni sintenici (Choi *et al.*, 2004b). Poiché si tratta di specie lontane evolutivamente circa dieci milioni di anni (Choi *et al.*, 2004a) si può concludere che c'è una maggiore sintenia a livello di microstruttura che di macrostruttura. Studi recenti, infatti, hanno rivelato che alcuni dei geni necessari per la nodulazione (*DMI 1* e *DMI 3* di *M. truncatula*) sono presenti e molto conservati sia in leguminose che in non-leguminose, ed i loro ortologhi possono essere inequivocabilmente identificati in specie come riso ed *Arabidopsis* (Ane *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2004). Ferrodova e collaboratori (2002) rafforzarono questa idea identificando 340 possibili sequenze consenso di geni associati alla nodulazione. Circa il 40% di esse presentano sequenze omologhe in specie di non leguminose. Un altro esempio è rappresentato dalla conservazione della microsintenia nei geni relazionati con la fioritura isolati previamente in *Arabidopsis* e successivamente in *Pisum* (Hecht *et al.*, 2005).

2.1.7 Scopo del lavoro

L'obiettivo generale di questo lavoro è stato quello di trasferire in *V. faba* una serie di marcatori (SSR e marcatori derivati da EST) precedentemente identificati nella specie modello *M. truncatula* ed in altre leguminose (*P. sativum*, *L. albus*,

G. max). Il vantaggio di tale approccio consiste nella riduzione dei costi per lo sviluppo di marcatori molecolari “*ex novo*” in una specie (*V. faba*) caratterizzata da risorse genetiche ed informazioni molecolari limitate.

Attraverso tale lavoro è stato quindi possibile saturare con marcatori molecolari robusti mappe genetiche preesistenti di *V. faba*. Ciò ha permesso un passo in avanti nel ridefinire, in distinti background genetici (differenti popolazioni ricombinanti), selezionati sulla base della resistenza espressa nei confronti di *A. fabae*, la posizione di geni e QTL associati a tale carattere e ad altri di interesse agronomico. L’associazione di marcatori molecolari a diversi caratteri di interesse e’ un requisito fondamentale per il successivo utilizzo di tecniche come la MAS (Marker Assisted Selection).

Le informazioni generate da questo lavoro saranno infine d’aiuto per lo sviluppo di una mappa genetica composta di *V. faba* e per poter migliorare le conoscenze ad oggi acquisite sul grado di sintenia tra le leguminose.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato era costituito da tre popolazioni RIL (*recombinant inbred line*) di *V. faba* ottenute nei campi sperimentali del centro di ricerca IFAPA (Instituto de Investigacion y Formacion Agraria y Pesquera) Centro Alameda del Obispo, in Cordoba, Spagna.

In particolare sono state oggetto di studio le seguenti popolazioni:

a) *Vf6 x Vf27*: tale popolazione è costituita da 124 individui F₆ ottenuti mediante l'incrocio intra-specifico tra le linee *Vf6* e *Vf27*, e selezionati seguendo il metodo *single seed descent*, in cui il parentale femminile *Vf6* è del tipo *equina* ed il parentale maschile *Vf27* è del tipo *paucijuga*.

La linea *Vf6*, è stata ottenuta da un lavoro di Sjodin (1971a, b) ed è stata successivamente impiegata in numerose indagini scientifiche grazie alla resistenza che mostra nei confronti di *A. fabae* e del suo alto grado di asinapsi (mancato appaiamento tra cromosomi omologhi durante la profase meiotica). Quest'ultima caratteristica è risultata utile in vari lavori di mappaggio, la linea *Vf6* è infatti capace di generare progenie trisomica che facilita l'individuazione di gruppi di linkage sui cromosomi. La linea *Vf27* presenta un insieme di caratteristiche ancestrali (Vaz Patto, 1997), apportando un grande livello di polimorfismo nell'incrocio con la linea *Vf6* tanto a livello morfologico quanto molecolare.

b) *Vf6 x Vf136*: tale popolazione è costituita da 165 individui F₆ ottenuti mediante l'incrocio intra-specifico tra le linee *Vf6* e *Vf136* e selezionati seguendo il metodo *single seed descent*. Le caratteristiche del parentale femminile *Vf6* sono state descritte precedentemente. La linea *Vf136* si è originata dall'incrocio tra *Vf1071 x Alameda* (Cubero e Hernandez, 1991). *Vf1071* è una linea resistente a *Orobanche crenata* selezionata a partire dalla cultivar Giza 402 (Cubero, 1992) ed *Alameda* è una cultivar commerciale adattata alle condizioni ambientali della Spagna meridionale (Cubero e Hernandez, 1991)

c) *Vf29H x Vf136*: tale popolazione è costituita da 119 individui F₆ ottenuti mediante l'incrocio intra-specifico tra la linea *Vf29H* e *Vf136* seguendo il metodo della discendenza da seme unico. Il parentale femminile, *Vf29H*, è stato fornito dai Dr. Berthelem e Le Guen (Station d'Amelioration des Plantes, INRA-Rennes,

France), ed è resistente a *A. fabae* (Tivoli *et al.*, 1987; Maurin e Tivoli 1992; Bond *et al.*, 1994; Sillero *et al.*, 2001). Il parentale maschile *Vf136* è stato descritto precedentemente.

2.2.2 *Analisi dei marcatori molecolari*

2.2.2.1 *Estrazione del DNA genomico*

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata a partire dalle foglie dei parentali e degli individui delle popolazioni RIL F₆, seguendo la metodologia descritta da Lassner e collaboratori (1989) e modificata da Torres e collaboratori (1993 a). Il DNA è stato quantificato mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro (UV-Visibile Spectrophotometer Model EvoLution 500) e successivamente portato ad una concentrazione d'uso di 30 ng/μl.

2.2.2.2 *Marcatori SSR (Simple Sequence Repeats) di Vicia faba*

Sono stati analizzati 54 microsatelliti precedentemente sviluppati in *V. faba* da Zeid e collaboratori (2009) (tabella 2.4) dopo aver ottimizzato le condizioni di amplificazione per le tre popolazioni RIL F₆ in esame. Le reazioni di polimerizzazione sono state effettuate in un termociclatore TGradient PCR (Biometra) utilizzando il seguente ciclo :

1. *denaturazione*: 95°C per 1 minuto
2. *annealing*: T per 1 minuto. T: la temperatura varia a seconda delle coppie di primer utilizzate (tabella 2.4)
3. *polimerizzazione*: 72°C per 1 minuto
4. *estensione finale*: 72°C per 7 minuti

Le fasi 1, 2, 3 sono state ripetute per un numero di cicli che varia a seconda della coppia di primer utilizzata (tabella 2.4).

La miscela di reazione standard per la PCR conteneva: 30 ng di DNA genomico, buffer di PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 2M betaina, 0,2 mM di dNTP, 20 μM di entrambi i primer (senso ed antisenso), 0,2 U di Taq polimerasi ed acqua distillata sterile.

I marcatori sono stati corsi su gel di agarosio (miscelando quantità equimolari di agarosio Seakem e Nusieve) al 2,5%-3%. La corsa elettroforetica è stata effettuata inizialmente ad un voltaggio di 60 V per cinque minuti e successivamente a 110 V

per circa 3 ore. Una volta terminata la corsa i gel sono stati immersi per 20 minuti in 250 ml di acqua distillata nella quale sono stati disciolti 3 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml) e visualizzati con un transilluminatore Kodak Digital Science Id ver. 2.0 e 3.5.

2.2.2.3 Marcatori SSR (Simple Sequence Repeats) di *Pisum sativum*

Sono stati analizzati quarantuno marcatori microsatelliti, sviluppati in *P. sativum* da Loidon e collaboratori (2005), per identificare loci SSR (tabella 2.5). Per poter trasferire questi marcatori ortologhi è stato necessario identificare le loro condizioni ottimali di amplificazione nelle tre popolazioni RIL di *V. faba* in esame, mediante l'utilizzo di PCR di gradiente effettuate nel termociclatore TGradient PCR (Biometra) con il seguente ciclo di polimerizzazione :

1. *denaturazione*: 94°C per 1 minuto
2. *annealing*: T per 1 minuto. T: la temperatura varia a seconda delle coppie di primer utilizzate (tabella 2.5)
3. *polimerizzazione*: 72°C per 1 minuto
4. *estensione finale*: 72°C per 5 minuti

Le fasi 1, 2, 3 sono state ripetute per 35 cicli.

La miscela di reazione standard per la PCR conteneva: 30 ng di DNA genomico, buffer di PCR 1X, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 20 µM di entrambi i primer (senso ed antisenso), 1 U di Taq polimerasi ed acqua distillata sterile. I marcatori sono stati corsi e visualizzati come precedentemente descritto per i marcatori SSR di *V. faba*.

2.2.2.4 Marcatori derivati da sequenze ESTs (Expressed Sequence Tags)

Nelle popolazioni RIL *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf136* sono state analizzate trentotto coppie di primer specifiche per marcatori derivati da sequenze EST sviluppate da Ellwood e collaboratori (2008) (tabella 2.6) e già mappati nella popolazione *Vf6xVf27*.

I marcatori vengono suddivisi in quattro gruppi :

1. ML: derivati dall'allineamento di sequenze EST di *M. truncatula* e *Lupinus spp.*;
2. MLG: derivati dall'allineamento di sequenze EST di *M. truncatula*; *L. albus* e *G. max* ;

3. GLIP: sviluppati all'interno del progetto GLIP (European Grain Legumes Integrated Project) basati sull'allineamento di sequenze di *M. truncatula*;
4. MP: sviluppati nel Dipartimento di Patologia Vegetale, dell'Università della California, Davis, e derivate dall'allineamento di sequenze EST di *M. truncatula* ed altre leguminose.

Per ciascuna coppia di primer è stata saggiata la capacità di amplificare il frammento di DNA atteso nei parentali delle tre popolazioni ed in cinque individui delle rispettive progenie.

Le condizioni di amplificazione sono state ottimizzate fino ad ottenere un prodotto di amplificazione unico e chiaro. La miscela standard per la reazione di PCR conteneva: 30 ng di DNA genomico, buffer di PCR 1X, 2 mM di MgCl₂, 0,2 mM di dNTP, 0,6 µM di entrambi i primer (senso ed antisenso), 1 U di Taq polimerasi ed acqua distillata sterile. La reazione di amplificazione è stata realizzata in un termociclatore PCR Eppendorf AG® (Eppendorf) con il seguente ciclo:

1. *denaturazione*: 94°C per 1 minuto
2. *annealing*: T per 1 minuto. T: la temperatura varia a seconda delle coppie di primer utilizzate (tabella 2.6)
3. *polimerizzazione*: 72°C per 1 minuto
4. *estensione finale*: 72°C per 8 minuti

Le fasi 1, 2, 3 sono state ripetute per un numero di cicli che varia a seconda della coppia di primer utilizzata (tabella 2.6).

A seconda del tipo di polimorfismo osservato, sono stati impiegati differenti metodi per genotipizzare le popolazioni F₆. In particolare, quando si osservava una differenza di peso molecolare nel prodotto di amplificazione, ovvero un polimorfismo diretto, questo veniva direttamente utilizzato per genotipizzare tutta la popolazione. I prodotti di amplificazione che invece risultavano monomorfici tra i parentali, sono stati successivamente digeriti con una serie di enzimi di restrizione che riconoscono da 4 a 5 bp. La digestione è stata realizzata con la seguente miscela di reazione: 0,2 µl di enzima di restrizione (2U/ µl), 2,5 µl di buffer di restrizione (10X), 10 µl di prodotto di amplificazione ed acqua distillata

sterile fino ad un volume totale di 25 µl. La reazione è stata incubata 12 ore in una stufa alla temperatura ottimale per ciascun enzima.

I marcatori sono stati corsi su gel di agarosio (miscelando quantità equimolari di agarosio Seakem e Nusieve) al 2% utilizzando come buffer di corsa 1X TBE.

La corsa elettroforetica è stata posta per i primi cinque minuti a 60 V, successivamente è stato aumentato il voltaggio a 145 V per circa 3 ore. Una volta terminata la corsa i gel sono stati visualizzati come descritto per i marcatori SSR.

2.2.3 *Analisi dei dati*

2.2.3.1 *Costruzione della mappa genetica*

Per determinare la posizione dei marcatori polimorfici nelle mappe genetiche relative a ciascuna delle tre popolazioni sono stati selezionati i marcatori che presentavano il rapporto atteso di segregazione Mendeliana pari a 1:1. Al fine di verificare il rapporto di segregazione dei marcatori è stato effettuato un test X^2 ($p > 0.01$) con $n-1$ gradi di libertà utilizzando la seguente formula:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - A_i)^2}{A_i}$$

Dove i = classe fenotipica

O = valori osservati

A = valori attesi

Sono stati inclusi nelle mappe anche marcatori precedentemente mappati in altri lavori ed alcuni marcatori la cui segregazione risultava leggermente distorta.

La mappa ed i gruppi di linkage sono stati elaborati con il programma JoinMap versione 4.0 (Van Ooijen, 2006) utilizzando un valore di LOD pari a 5 per la popolazione *Vf6 x Vf136* e un LOD pari a 4 per le popolazioni *Vf6 x Vf27* e *Vf29H x Vf136*. Le frazioni di ricombinazione sono state convertite in centiMorgans (cM) utilizzando la funzione di mappaggio di Kosambi (1994).

2.2.3.2 Mappaggio dei caratteri QTL

Per individuare e mappare i QTL di resistenza ad *A. fabae* sono stati impiegati i dati utilizzati per costruire le mappe genetiche delle popolazioni *Vf6 x Vf136* e *Vf29H x Vf136* ed i dati quantitativi di resistenza ad *A. fabae* ottenuti da test di patogenicità. In questi test, previamente condotti presso il laboratorio di “*Mejora y Biotecnología*” della Prof.ssa Ana M. Torres, IFAPA centro Alameda del Obispo, Cordoba, Spagna, è stata saggiata la gravità della malattia sulle foglie (*disease severity on leaves*, DSL) e sui fusti (*disease severity on stem*, DSS) (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). I genotipi derivanti dalle mappe genetiche ed i dati quantitativi di resistenza ad *A. fabae* sono stati utilizzati come input per il programma MapQTL versione 5.0 (Van Ooijen, 2004), con cui è stata effettuata l’analisi dei QTL mediante il metodo del *simple interval mapping* (SIM) e del *composite interval mapping* (CIM).

I marcatori molecolari, usati come cofattori, sono stati selezionati mediante il metodo del Forward-Backward Stepwise Regression. Il valore soglia di $\alpha=0.05$ per la significatività dei QTL è stato stimato mediante un’analisi di permutazione (Churchill e Doerge, 1994) utilizzando 1000 permutazioni. Per la posizione di ciascun QTL è stato calcolato l’intervallo di confidenza del LOD 1 e LOD 2, in accordo con quanto descritto da Darvasi e Soller (1997).

Tabella.2.4. Condizioni per l'amplificazione dei marcatori SSR di *Vicia fabae*.
*marcatori le cui condizioni di amplificazione sono state modificate rispetto a quelle indicate da Zeid e collaboratori (2009).

nome marcatore	primer forward	primer reverse	Tm C°	MgCl ₂	numero cicli
VfG 1*	TTCAGCAAACCTAGAACCAATC	GGCAITCAGTTTTACCTTGTA	50	1,5	30
VfG 2	AGGGGTCCAAGGGGTAAAT	ACAGGGAAGCATCAACAATG	50	2	30
VfG 3	TTCTTTGGTCTCTCTATC	GCAGTGTGTGCTGATACAA	50	2	30
VfG 4	AAGGGGAGGGCATAACAGAA	AATCCGCAAGGGTCTTCTT	50	2	30
VfG 6*	CCTAACAGAATATAAATCAGGTTCA	GATGCAAGGTTGCAGATTCT	50	3	35
VfG 7*	AGGCATGTGGTGTTTGAT	GCAATAAAAATATGCTTTCTGGA	50	3	30
VfG 8*	ATGGGCAGAGGAGGATAAAA	ATCATCCAGGAGGGAGAAAA	50	3	30
VfG 9	GGTTTTGAATAGAAATGCAA	AAGATGTGCAATATGTTTT	50	2	30
VfG 10*	ACAAAAACGCGCACTTATCA	AAGAGAGAGAAGAGAGCTTC	50	3	30
VfG 11	GCAAAAGGAGAGCAAGGGAA	CGAAAGAGGGGACATTTTGT	50	2	30
VfG 13*	GGTTGGGATCTTTAGGTTGAA	TGGCCTTATATCCGTCCAAT	52	1,5	35
VfG 14	CAAGCTTGTGAGAGCCAAA	GAACGAGGCTCACGAAAATA	50	2	30
VfG 15	TCGATAGGGTTTCAGATTGA	GATGTTGACGGTGGTGT	50	2	30
VfG 16	TGCTCCAAAGGAAAACGTT	AGAGAGGGTACTGAGATTA	50	2	30
VfG 19*	AGCGATGGTGTCTAIGCTTA	TCTCTCACGGAATCACATCTTT	52	1,5	35
VfG 21	CTGAGCAAGTTTTCTATGAC	ATATGCCACATGGTAGCTTT	50	2	30
VfG 22	GGCTATGTACGAACAAT	GATTCAGACCCGATACATT	50	2	30
VfG 24	GTGTCATCGACCACATGGTTA	CAGCTGAGCACGAGACTAA	50	2	30
VfG 27*	CCCAAAAAGAGACGAACGTAT	AGGGTTCATACGTTTGGCTT	50	1,5	30
VfG 28*	AGAGTCCCAAAGAGTGGGTT	CCAAAGGCAAAAATGAGGGCTT	50	1,5	30
VfG 29	GGACTTTTTATGGAGGTATCA	CCATGCCCTGATTTTGCCAA	50	2	30
VfG 30	GTAAGACGGGGAGCAGAA	TCCAACCTCTATCCTCTCTCT	50	2	30
VfG 31	ATAAGAGAGAACGAGGGAGAA	TTATGGTGGGACGTCTTACAT	50	2	30
VfG 33	CAGATATTCATGGTTGAGTAT	GTCAAACCATTTACTTCACTT	50	2	30
VfG 34	GCACCTCGAAGGAATTAATTT	GAACAGTTGTTTCGTGTCGTA	50	2	30
VfG 36*	CATCATCCAGGAGGGAGAA	GGGCAGAGAGGATAAAAAGA	50	3	30
VfG 37*	AACGAGAGTGAGGTTACTTC	AACTCTCTCTCCATGCATA	50	3	30
VfG 38*	GACAGCTTGCGTATTTTCAA	GCTCGAAGAAAGTAGAAGAA	50	2	35
VfG 40	GGAGGGAGAAAACGTGAGAT	GCAGAGAGGATAAAAAGAGAAG	50	2	30
VfG 41	AGCCCATGGTTCAAATGCAA	GCAGTCATGCCACTGCTTA	50	2	30
VfG 42	GATGGACCGGTTCTGGATT	CCCTAATCCCTTCACTAATACA	50	2	30
VfG 44	GATGTTGTTGGTGTGTTTA	CAATTAGGAGCAAAATCAGA	50	2	30
VfG 45	GTTATAGAAAAGTAAATGAGATAG	AGAACAGTGGTCTTGCAAA	50	2	30
VfG 46	GTCTGGAAAAAAGAAAAGAGA	AAAGAAAACCTCTCTCCAT	50	2	30
VfG 47	CGATTGTTGCAGAGGAGATA	ACAGAGAGGGACAGAGAGAA	50	2	30
VfG 53	GGTTCATGAAAAGAGGTTAG	CATTTCCGTTCTCTCTCTA	50	2	30
VfG 55*	ATCATCCAGGAGGGAGAAAA	ATGGGCAGAGAGGATAAAAA	50	3	35
VfG 57*	AGAGTGAGGTTGCTGCCAT	ACCTCTCTCTCCATGCATA	50	1,5	30
VfG 58	TGATGGTGCAACTCACCGAT	CTCTCTCTCACGGAATCACAT	50	2	30
VfG 61*	GCCGATATTTCTTTTGACA	TGAATGCTTCACTAACAA	50	3	35
VfG 62	AACTTCTGACTTCTCTCA	AGCGGAAATGTAATAATCCTA	50	2	30
VfG 63	GAGAGGCGGTTATGTTGTTA	GATCTCTCTCTCTCTCT	50	2	30
VfG 67	GTTCAITCAAGCACCAATCTAAAC	TCAATTTGGTTTATCTCTCTCT	50	2	30
VfG 68	AGGCATCAGTTGGTACTTG	CTCTGCATCCCACTGATA	50	2	30
VfG 69*	ATTGGGGAGGATGAAGGTT	TCCATTTCCGTTCTCTCT	50	1,5	30
VfG 77	AGTTGAGGTTTTGAACCCAA	AGGAGGCCTGGTTGTTTA	50	2	30
VfG 80	GATGTTTATGGGAAAATCTGAT	TCCTTGACAAAAAACAATTTG	50	2	30
VfG 81	GTCTGGAAAAAAGAAAAGAGA	AAAGAAAACCTCTCTCCAT	50	2	30
VfG 82	TTGAACCCAGCCGCCGCTGA	AGGGGACGCTCATTTTGTG	50	2	30
VfG 84	GATACACGCGACTGCCTCAA	GTGAGTTGTTGGAGAGGATGAT	50	2	30
VfG 86	TCCTGGAAAAAAGAAAAGAGA	AAAGAAAACCTCTCTCCAT	50	2	30
VfG 87	AGGGCCAGCGTGATCCAATA	TGGGTTGGGATCTTTGGTTG	50	2	30
VfG 88	TAACGAGAGTGAGGTTGCT	ACCTCTCTCTCCATGCATA	50	2	30
VfG 89	TTGTCAAGAGAGGCGGTTA	CACACGATCTCTCTCT	50	2	30

Tabella.2.5. Condizioni di amplificazione dei marcatori SSR di *Pisum sativum*.
*marcatori le cui condizioni di amplificazione sono state modificate rispetto a quelle indicate da Loridon e collaboratori (2005).

nome marcatore	primer forward	primer reverse	Tm C°	MgCl ₂	numero cicli
AC76a	CCCAATCCAATAAATAAAGAAA	AATGGTGTGTTATGCCATTTT	50	1,5	35
D21	TATTCCTCCTCCAAAATTCCTT	GTCAAAATTAGCCAAAATTCCTC	51	1,5	35
AA205	TACGCAATCATAGAGTTTGGAA	AATCAAGTCAATGAAACAAGCA	51	1,5	35
AA332	TGAAAAATAAAGGCATGCAATA	TGATTAGTCAACTTGTGTGGA	51	1,5	35
D23	ATGGTTGTCCAGGATAGATAA	GAAAACATTGGAGAGTGGAGTA	51	1,5	35
AB25	TTTCTACTCAAAACACTCGGCT	GATGCCATTGCTGAAGGAGATT	51	1,5	35
AD174	GGAGGGATGATTCTAACAAAGGT	AACTCCACTCCTCGAACTATT	51	1,5	35
AD270	CTCATCTGATGCGTTGGATTAG	AGGTTGGATTGTGTTTGTGTTG	51	1,5	35
AD57	GTTTTCTATGATGGTTAAAGGTG	GAGTAAGCAAAGTACTAGTGGA	51	1,5	35
AA315	AGTGGGAAGTAAAAGGTGTAG	TTTCTACTAGATGATATTTCGTT	51	1,5	35
AA241	GAAGCATTCTACTTGATGAAATT	GTTAGTGACCTGATACCACTG	51	1,5	35
AD160	ACCAGTCAAATGGTTAGAAAAGT	GAATGGAAAAGAGAATCAAGTT	51	1,5	35
AD59	TTGGAGAATGTCTTCTCTTTAG	GTATATTTTCTACTCAGAGGCAC	51	1,5	35
AA446	TAGCTTGACGCCACTC	ATCCGACCCATGGATTA	51	1,5	35
AB28	CCTGAGTCATCACATAGGAGAT	GCAGAAGTATTGACTTGATGGAA	51	2,5	35
AB40*	AAATAGACCCCTTGTGTAGAACG	GGAAAAGTGGGTTTTGAA	50	1,5	35
A6	CTTAAGAGAGATTAATAAGGACAA	CCAATCATAATAAAGATTCAA	51	2,5	35
PSBLOX2	CTGCTATGCTATGTTTACATC	CTTTGCTTGCAACTTAGTAACAG	54	1,5	35
AA491*	GAGGTGGTGTGAATTTGTG	CCTAATTTTACCCTCTCTCTCT	50	1,5	35
AA349	ACCATGAATCCCATATAGAGAG	GTTTGATCCCAATATCTTACCA	55	1,5	35
AA399	CCATTGGTATATGAAAATCGCT	TCCCAATTAATATGGCTAGGCT	55	1,5	35
AC74	CCTTAGTGTCTTCAACTC	ACAGAACCAAGTTATCAATA	55	1,5	35
AB140	CCAGATTCAATGAAAGGCATACA	GATGAAAATTCGTTTCTCTGTCTC	56	1,5	35
AB133	GCAGAAGCATTATTGCGG	AACATGGAATCTCAACAAACGGA	56	2,5	35
AB33	CATTGAATTTGTGGGAGAAAAG	TGTGGATGTTGCAATTTCTG	56	2,5	35
AA504*	TGAGTGCAGTTGCAATTTTCG	TCAGATGAAGAGCATGTGGG	60	1,5	35
AB100	CACAAATAATGGGGAAGTGACAAAG	GGAGATCATGAGGAAAGAGACGA	61	1,5	35
AD83	CACATGAGCGTGTGTATGGTAA	GGGATAAGAAGAGGGAGCAAAT	61	1,5	35
AA175	TTGAAGGAACACAATCAGCGAC	TGCGCACAAACTACCAATAATC	61	1,5	35
AA5	TGCCAATCTGAGGTATTAACACC	CATTTTTGCAGTTGCAATTTCTG	61	1,5	35
AB141*	ATCCCAATCTCCACCAATGTT	AGACTTAGGCTTCCCTTCTACGACTT	50	1,5	35
AB64	GCATTCATTGCGGTTGCATTAT	GAGTGACAGGTGCCACATTGA	61	1,5	35
AD81*	GTTTCATAAGTGGCTCTGATACC	GCAGGAGCATTGAGAAAGTTGT	50	1,5	35
AA122*	GGGTCTGCATAAGTAGAAGCCA	AAGGTGTTTCCCCTAGACATCA	59	1,5	35
AA219	ATTTGTGCAATTGCAATTTCAAT	CGAAAACGCTTTGCATCCTA	61	1,5	35
AB23	TCAGCCTTTATCTCCGAACATA	GAACCTTGTGCAGAAGCAITTA	61	1,5	35
AD280	TGGTGCTCGTGATTAATTCACATA	ACTAAACAACCAACTGCCAAAAGT	61	1,5	35
AA335	ACGCACACGCTTAGATAGAAAT	ATCCACCATAAGTTTGGCATA	61	1,5	35
AD135	TGCGATTAGATTCTCCAGCACA	TGAGGAGGTGAACGTAAGCA	61	1,5	35
AA321*	CTGCAGCCTGTACAAGTGG	GTACATACAAAATAATTCCTTCAG	61	1,5	35
AA416	TTACTGTTACTTTGCGACATCA	ATAGTGTGCAAAATTTCCATCC	61	1,5	35

Tabella. 2.6. Condizioni di amplificazione per i marcatori EST.

nome marcatore	codice	primer forward	primer reverse	Tm C°	MgCl ₂	numero cicli
1433P	MP	AAAGTTTCTACCTTAAGATGAAGGGAG	GTTTAGCAAGATTGCGAGGCACGGA	60	2	35
6DCS	MP	CTCAGGAAAGCCATTGGAGCCAGCAACT	TGCCATGAGCATCAGCCAAITCTTTGA	58	2	40
AI6Pb	MP	CTGATAGGGCCAGAGGAGGGAAGA	GTTTTTAGCAATTTGGACGAATGTTGGT	58	2	40
AmMS13	MLG	GCAGCGTCCCTCCAAAGTCC	AGGACCCATGAGAAATCAATCACTCC	60	2	35
HRP2	MP	TTTATGGTCTCCAAAAGTGCMAAATTTGT	ATATTTAGGATTTGGTCCATCAGCTCA	60	2	35
JUNP3	MP	TCCTTCGTCATCTTCGGGATAGCACA	GGATGTGAAATGATCCATCCACAGACA	58	2	40
1G038	MLG	GTTGAAACTAATGTGGAGCCCTTAACAC	CCTCACACTGGGTTGGGTTAACCC	60	2	35
1G041	MLG	TGCTTGGAGATTCGTCCTCC	CAACTGTTCCTGCTTGTCTATTAACC	60	2	35
1G054	MLG	TCGTCTTATGACCCGCTACCTTCAG	AATGGACATTCCTGCTCATTTCGTG	58	2	35
1G102	MLG	GCACACCTTGGTTCTAGAGGGC	GGCGTTTGAAGGAGGCTAAGAAGC	58	2	40
1G107	MLG	CAAGGCTTCCTCCTCAACATATCTG	GGTACTTGTGATAATTTGGTTCCTCC	55	2	40
1G31	MLG	CCTTCCATACGTTTCATAGGAAAGGGTCC	CCGTTTCTGGCCATCAATTCGG	55	2	40
1G68	MLG	CGCACAGGATTTGGTGCAGTTCC	TCCTGGATTCATTTGGAAAGACATTTG	58	2	40
1SSR9b	MLG	CAAAGGATGGTTTCTTTGTAAGTTC	CCTGGCACATTTCTCTACCCA	60	2	35
Lup 123	ML	GCTCTCAGATCTTATCAACCTT	ACTTCACTATCTTCTCCAGGG	58	2	40
Lup 123	ML	GAAAGGATGGTTTCTTTGTAAGTTC	ATTCTAAGATAAGGGACCAAGT	60	2	35
Lup066	ML	GAAAGGAGAAATTAAGGAGGCTTA	CCACTTCCATGACAAATCT	60	2	35
Lup185	ML	GGATGTGACAAAACAAGGATT	GAACAGACTTCTCTCTACGTTCT	55	2	40
Lup280	ML	TAAGCTAATGGGAAAGATCTGTAAC	GGGATATCAAGACCGTTATTAG	55	2	40
Lup299	ML	TAAAGGATGGGATTAATCAAGT	CCAGATCTACAAATCTTAGCACCG	60	2	35
Lup346	MP	GATGGGGATCGAGAAATATTCGGGC	CTTGTGTCAAAATGCATTTTGCATCTTC	60	2	35
MMS1a	MP	TACTTGGGAGGTTTTTGCATTTGGCA	CAAAATAAAGTCTTTGGCAGCAGGTAG	55	2	35
Ms_U182	MP	GTTAAGGGAAACCATGACCAACCACA	CATTCATGTGTCATACCAAAGCAACCA	60	2	35
Ms_U515	MP	CGTGTCTTCTCCTCGTCTTAC	TTGGCTCCAGCAATATAGGC	60	2	35
ML_107	MLP	CGTGTGACAAACAATTCATGTC	GCACCTTACCAGGTCATATGAT	60	2	35
ML_1109	MLP	ATGAGCAAAAGAAAGGCCAAA	TACCAGCAGCTGGTTGATGT	60	2	35
ML_1115	MLP	TTCTIAGCAGGGCTCTTTCA	AGCTGAAACATGGGCTCACT	60	2	35
ML_1130	MLP	CATGCTGCTGCAATTTGGCTAT	AGGAACAGCTACAAAGGGGGT	55	2	40
ML_1951	MLP	GGAAAATGTCAAAACAAGGGCT	CATGATTCAGCGAAGCAAGA	60	2	35
ML_0757	MLP	AAAAGGCTGTGCTCAAGGAT	ATCCCTCTTTGGCAACCATCTG	60	2	35
ML_0866	MLP	TGCAATGATTTTGGCACCTTA	CTTTTGGCCAAAGTACCAAGGA	58	2	40
ML_0999_	MP	GGAAAGCTCCATCATGAGACTTA	ATTGCAACCCATTTGCAAGCCCTTGAGA	60	2	35
PepC	MP	TGGCAGCTATMAAAGGCTCAGGAG	GAAANACTCAACAAAACGTTGGTTCTTGA	60	2	35
REP	MP	GCCCAITTTCTCTCGTCGGTACTTC	GCTVAAAAGATATCATCTCCGGTATCCA	60	2	35
RNAR	MP	GTTTGGCAGATTTGGGGTGTGAAGA	GGTAGGGCAATGATMAGAAAGGTTTACACA	60	2	35
SAT	MP	GTATCATGATGATGATTCATTTTCTGTC	AGCCCTTTCATMGACACTGCACCTCA	60	2	35
TBB2	MP	TGTTGGATTCACAAGAACATGATGTG	TTTCATACTCATCTCTCTGCGAGTA	60	2	35
IRALS	MP	GGTCTCGAGGCTGTTTTTGGAGAAG	GCAATTTCCCTCTCAGACTA AAAAGTGG	60	2	35

2.3 Risultati

2.3.1 Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL Vf6 x Vf136

Nella popolazione RIL F₆ Vf6 x Vf136 sono stati individuati 18 marcatori polimorfici. Sono tutti marcatori derivati da sequenze EST, le cui condizioni ottimali di amplificazione sono descritte nella tabella 2.6. Di questi, quattro hanno mostrato un polimorfismo diretto di tipo ALP (*amplified length polymorphism*) ed i restanti 14 non mostravano variabilità dopo la corsa elettroforetica su gel di agarosio (figura 2.5 A e B). Per questi ultimi sono stati utilizzati degli enzimi di restrizione in grado di digerire differenzialmente i prodotti di amplificazione ottenuti dai parentali, sviluppando quindi marcatori di tipo CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*). Nella tabella 2.7 sono riassunti il tipo di polimorfismo identificato per ciascun marcatore e la dimensione dell'amplicone ottenuto (con o senza digestione enzimatica) per entrambi i parentali della popolazione RIL.

Tabella 2.7. Tipo di marcatori polimorfici identificati nella popolazione Vf6 x Vf136 classificati per codice. Per i marcatori CAPS è specificato l'enzima di restrizione utilizzato.

nome marcatore	codice	tipo polimorfismo	dimensione frammento polimorfico (bp)	
			Vf6	Vf136
Mt_0757	GLIP	CAPS/MnII	480	278
Mt_1109	GLIP	ALP	550	510
Mt_1130	GLIP	CAPS/EstuI	290+280	280+270
Mt_1951	GLIP	CAPS/MboI	227	220+175
Lup_299	ML	CAPS/ApoI	420	270+230
Lup280	ML	ALP	1160	1000
Lup66	ML	CAPS/TaqI	280	270
AnMtS13	MLG	CAPS/RsaI	360	360+300
LG31	MLG	ALP	460	425
LG41	MLG	CAPS/HphI	225	175
LG54	MLG	CAPS/HphI	227+179	285
LG68	MLG	CAPS/AciI	185	240
LSSR9	MLG	CAPS/Hpy8I	335	237+205
6DCS	MP	CAPS/MseI	228	228+212
AIGPb	MP	ALP	310	-
HBP2	MP	CAPS/TaqI	470	390
SAT	MP	CAPS/AciI	240	335
TBB2	MP	CAPS/HaeIII	448	257

Di questi 18 marcatori quattro vengono ascritti al gruppo GLIP (sviluppati all'interno del progetto GLIP e ottenuti dall'allineamento di EST di *M. truncatula*), tre al gruppo ML (ottenuti dall'allineamento di EST di *M. truncatula* e *Lupinus ssp.*), sei al gruppo MLG (ottenuti dall'allineamento da EST di *M. truncatula*, *L. albus*. e *G. max*) e cinque al gruppo MP [sviluppati da Choi e collaboratori (2004b) e derivanti dall'allineamento tra sequenze EST di *M. truncatula* e di altre leguminose].

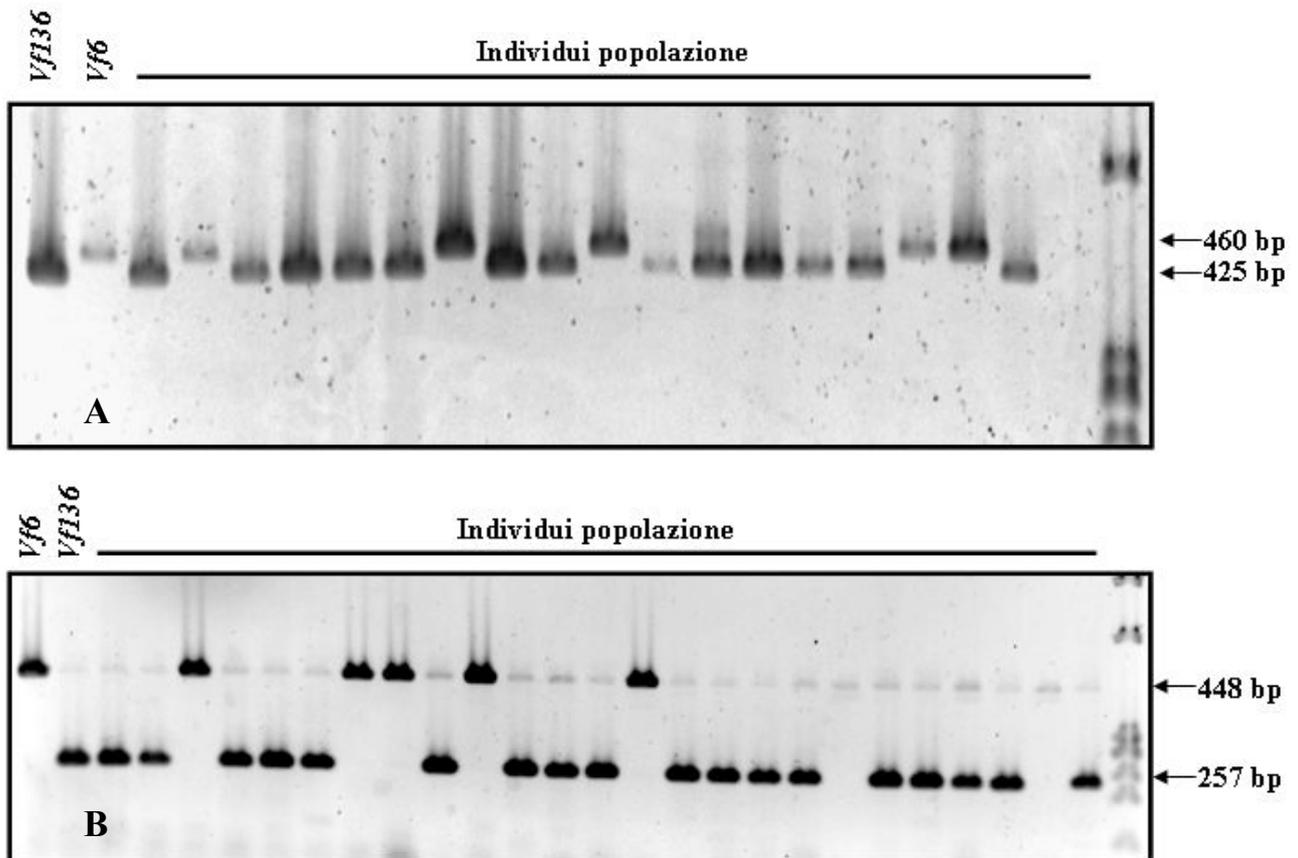
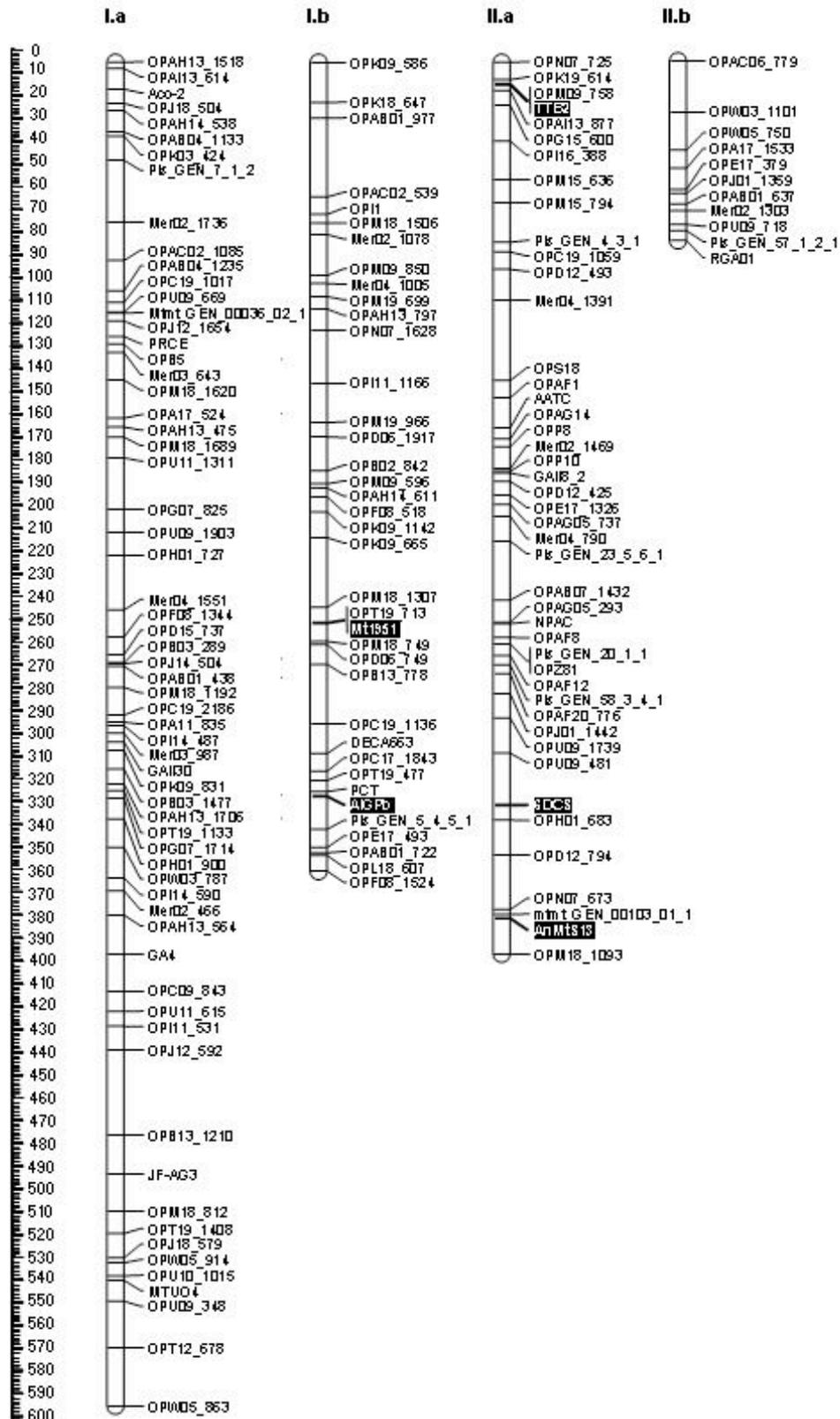
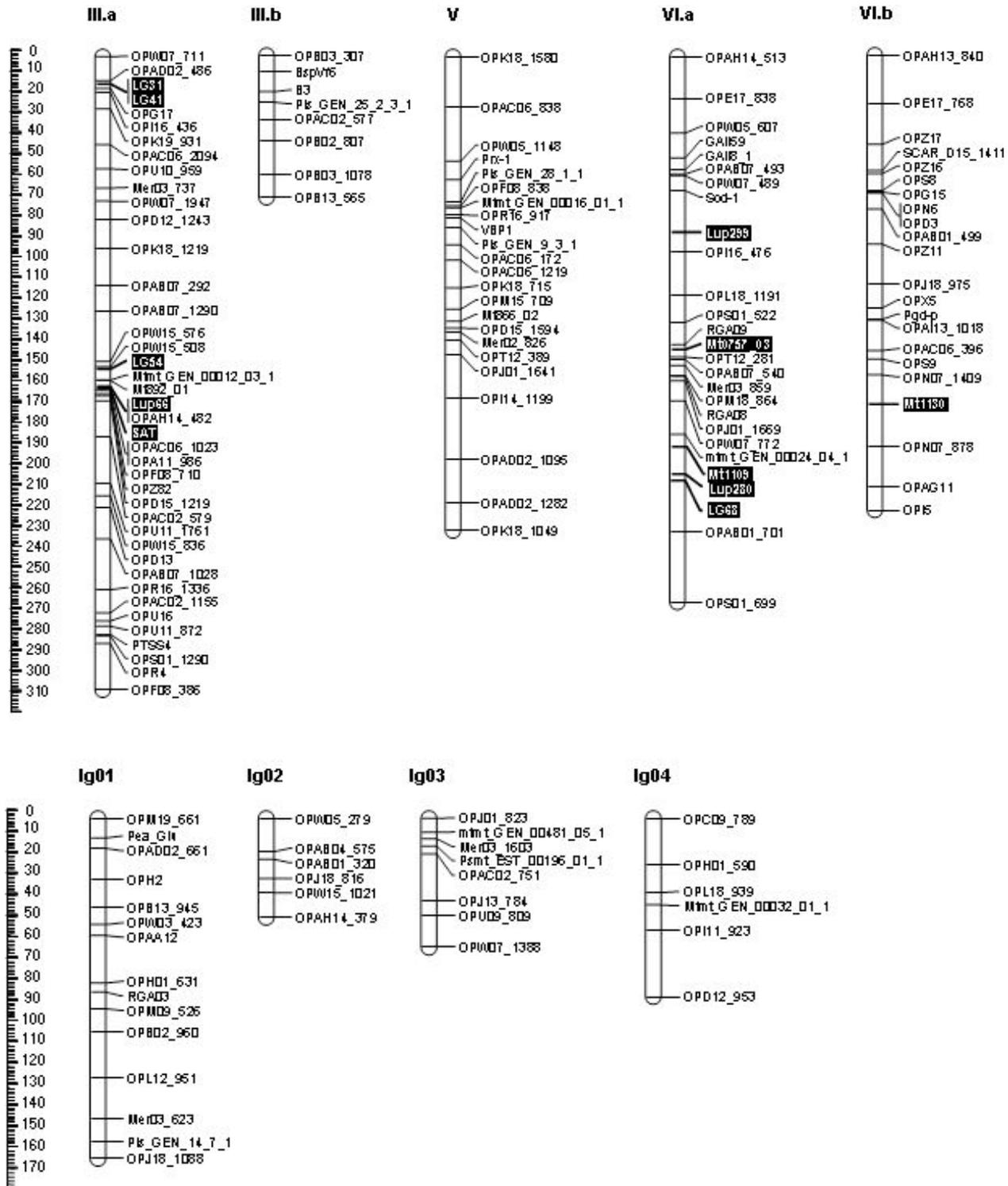


Figura 2.5. Esempi di marcatori molecolari derivati da sequenze EST, analizzati nella popolazione *Vf6 x Vf136*, aventi un polimorfismo di tipo ALP o CAPS. **A:** marcatore LG31 con polimorfismo di tipo ALP. **B:** marcatore TBB2 con polimorfismo di tipo CAPS successivamente alla digestione enzimatica con HaeIII.

Grazie all'introduzione di questi nuovi marcatori è stato possibile implementare la mappa genetica della popolazione RIL F_6 *Vf6 x Vf136* precedentemente descritta da Diaz-Ruiz e collaboratori (2009). La mappa include, oltre ai marcatori sviluppati nel corso di queste indagini, anche marcatori sviluppati in lavori precedenti, ed è costituita da un totale di 335 marcatori (272 RAPD, 4 isoenzimi, 49 EST, 1 SCAR, 6 SSR, 2 proteine di riserva 1 defense related genes) mappati in

21 gruppi di linkage, con una distanza media tra i marcatori di 11,82 cM ed una copertura del genoma pari a 3096,3 cM, risultando ad oggi la mappa genetica di *V. faba* con il più alto tasso di saturazione di marcatori (figura 2.6).





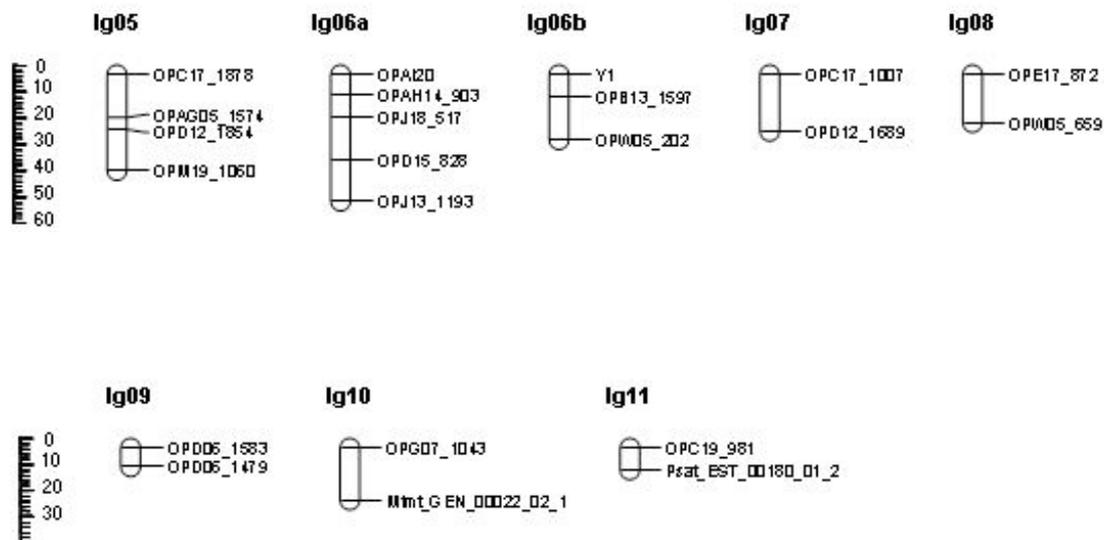


Figura 2.6. Mappa genetica della popolazione *Vf6 x Vf136*. Sono evidenziati in nero i marcatori identificati in questo lavoro.

Per nove dei 21 gruppi di linkage individuati è stato possibile assegnare una specifica posizione cromosomica, in quanto presentavano marcatori comuni a gruppi di linkage già mappati e localizzati in studi precedenti (Torres *et al.*, 1993; Satovic *et al.*, 1996; Vaz Patto *et al.*, 1999) nei quali erano state utilizzate linee trisomiche.

Dei 18 nuovi marcatori polimorfici 16 sono stati inseriti nella mappa genetica e ascritti a specifici cromosomi di *V. faba* mentre due marcatori (LSSR9 e HBP2) non sono risultati associati ad alcun cromosoma o gruppo di linkage (tabella 2.8).

Tabella 2.8. Localizzazione cromosomica dei marcatori polimorfici identificati nella popolazione *Vf6 x Vf136*. Ch: cromosoma.

marcatore molecolare polimorfico	localizzazione cromosomica
	<i>Vf6 x Vf136</i>
Mt_1951	Ch I b
AIGPb	Ch I b
TBB2	Ch II a
6DCS	Ch II a
AnMtS13	Ch II a
LG31	Ch III a
LG41	Ch III a
LG54	Ch III a
SAT	Ch III a
Lup66	Ch III a
Lup280	Ch VI a
Mt_0757	Ch VI a
Mt_1109	Ch VI a
Lup 299	Ch VI a
LG68	Ch VI a
Mt_1130	Ch VI b
HBP2	non associato
LSSR9	non associato

2.3.2 Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL Vf29H x Vf136

Nella popolazione RIL F_6 *Vf29H x Vf136* sono stati individuati un totale di 18 marcatori polimorfici (per le caratteristiche e condizioni di amplificazione vedere le tabelle 2.6 e 2.4). Di questi 15, sono marcatori derivati da sequenze EST (tabella 2.9) e tre sono marcatori microsatelliti (tabella 2.10). Nell'ambito dei marcatori EST, due presentano un polimorfismo di tipo ALP ed i restanti 13 un polimorfismo di tipo CAPS. Nella tabella 2.9 sono indicati per ogni marcatore: il tipo di polimorfismo e la dimensione del frammento polimorfico per entrambi i parentali della popolazione. Dei 15 marcatori di tipo EST, sei appartengono al gruppo MP, tre al gruppo MLG, due al gruppo ML e quattro al gruppo GLIP.

Tabella 2.9. Tipo di marcatori EST polimorfici identificati nella popolazione *Vf29H x Vf136* classificati per codice. Per i marcatori CAPS è specificato l'enzima di restrizione utilizzato.

nome marcatore	codice	tipo polimorfismo	dimensione frammento polimorfico (bp)	
			<i>Vf29H</i>	<i>Vf136</i>
Mt_0757	GLIP	CAPS/MinI	353+262	500
Mt_1130	GLIP	CAPS/BstUI	360+250	280+270
Mt_1951	GLIP	CAPS/MboI	277	220+175
Mt_1109	GLIP	ALP	538	510
Lup_299	ML	CAPS/ApoI	430	270+230
Lup66	ML	CAPS/TaqI	280	270
AnMtS13	MLG	CAPS/RsaI	360	360+300
LG31	MLG	ALP	460	425
LG68	MLG	CAPS/AciI	185	240
MMK1a	MP	CAPS/AluI	276+226	435+161
RNAR	MP	CAPS/RsaI	465	412
1433P	MP	CAPS/TaqI	469+214	290+271
6DCS	MP	CAPS/MseI	228	228+212
HBP2	MP	CAPS/ApoI	470	295
TBB2	MP	CAPS/HaeIII	472	257

Nel caso dei marcatori SSR risultati polimorfici (VfG1, VfG28 e VfG 69) due mostrano un polimorfismo di tipo ALP (VfG28 e VfG69) ed uno (VfG 1) un polimorfismo di tipo P/A, ovvero presenza della banda polimorfica in uno dei due parentali e assenza nell'altro (tabella 2.10).

Tabella 2.10 Marcatori SSR polimorfici identificati nella popolazione *Vf29H x Vf136* .Sono indicati il tipo di polimorfismo e la dimensione della banda polimorfica ottenuta per entrambi i parentali.

nome marcatore	tipo polimorfismo	dimensione frammento polimorfico (bp)	
		<i>Vf29H</i>	<i>Vf136</i>
VfG1	P/A	-	270
VfG28	ALP	250	200
VfG69	ALP	190	200

Nelle figure 2.7 A e B sono mostrati due esempi di marcatori microsatelliti polimorfici.

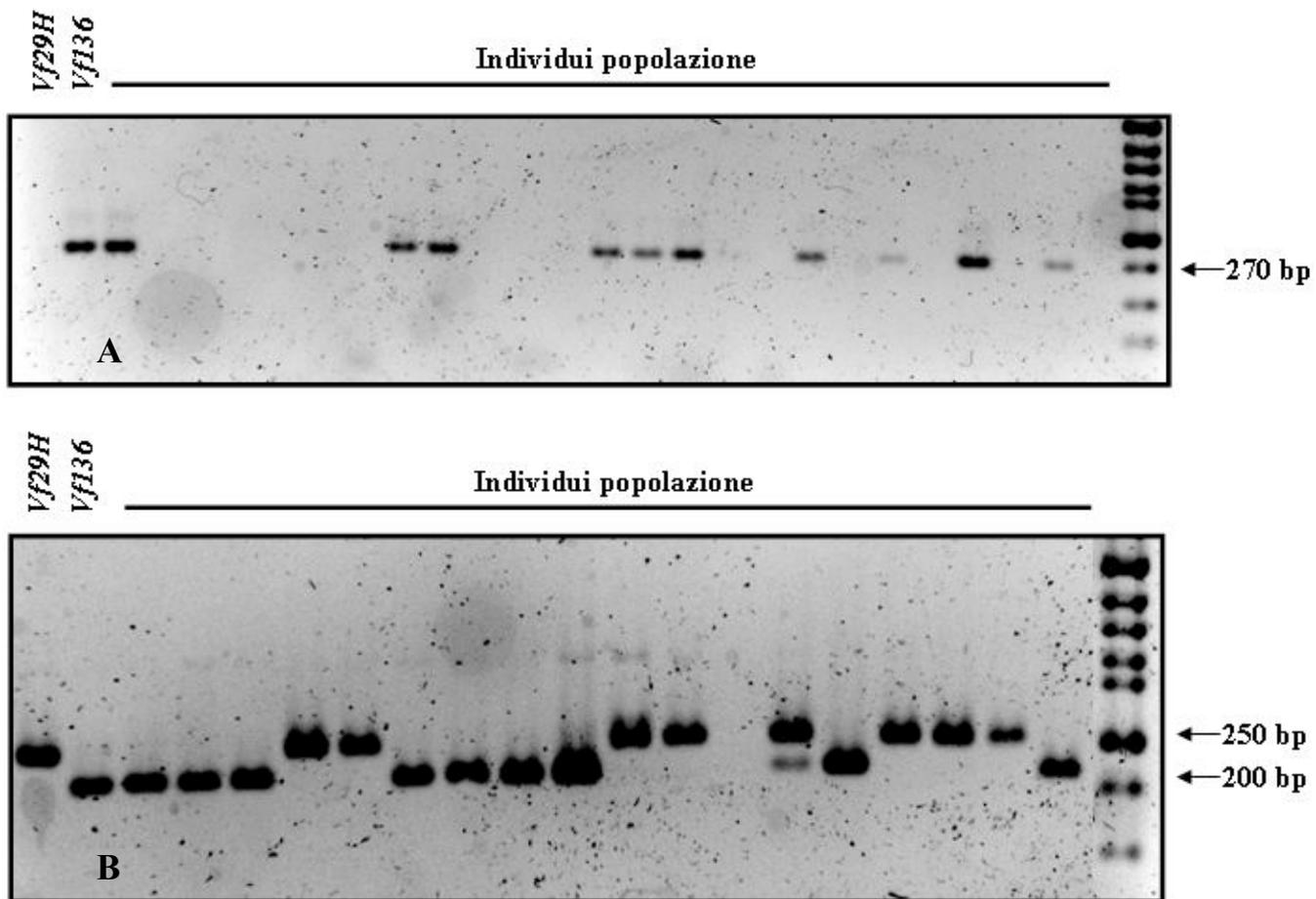
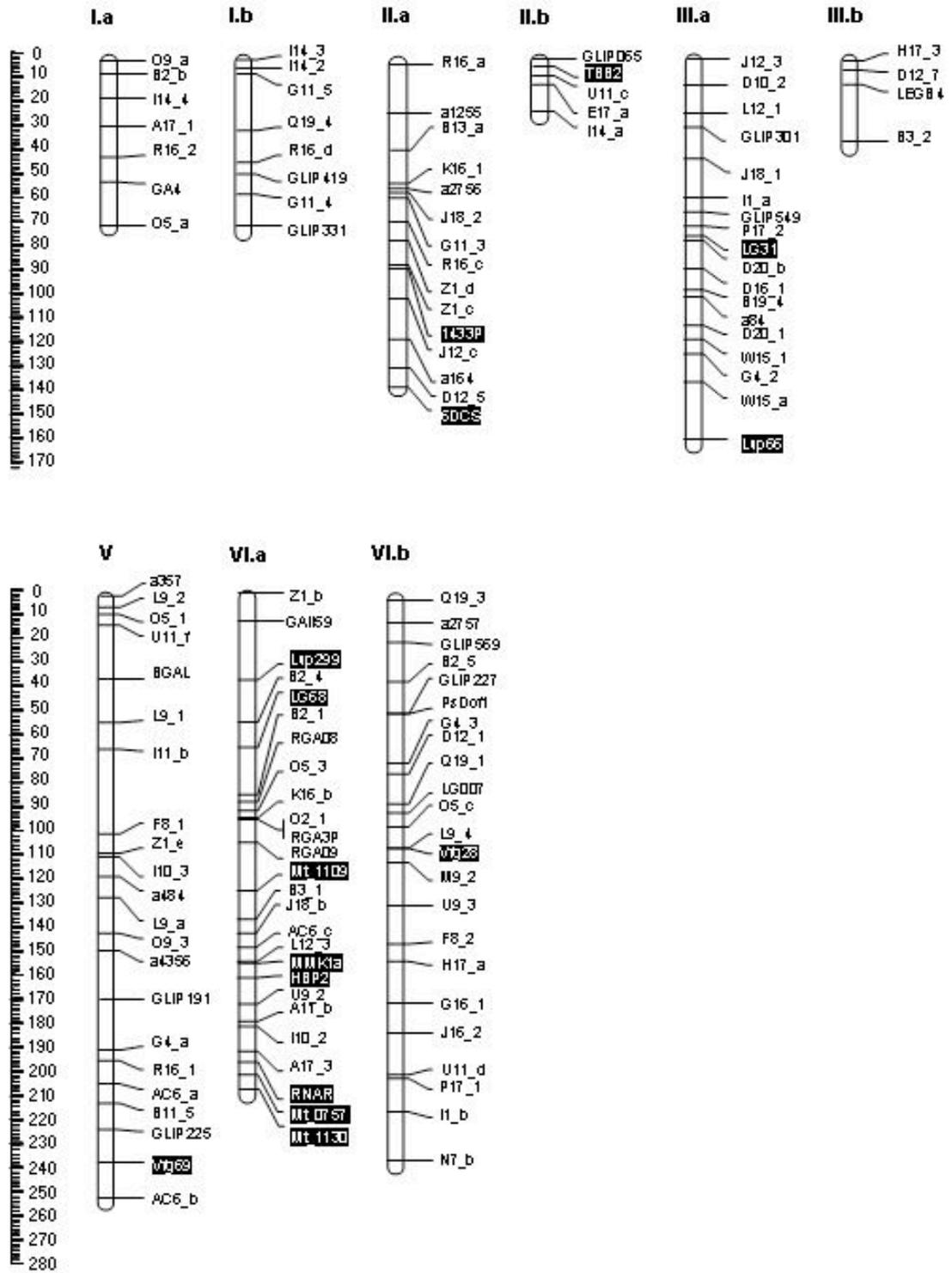


Figura 2.7. Esempi di marcatori molecolari SSR, analizzati nella popolazione *Vf29H x Vf136*, aventi un polimorfismo di tipo P/A o ALP. **A:** marcatore VFG1 avente un polimorfismo di tipo P/A; **B:** marcatore VFG28 avente un polimorfismo di tipo ALP.

L'identificazione di questi 18 nuovi marcatori ha permesso di aumentare il grado di saturazione della mappa genetica della popolazione RIL F₆ *Vf29H x Vf136* (figura 2.8), precedentemente sviluppata (Avila *et al.*, 2004, Carmen Avila, comunicazione personale).



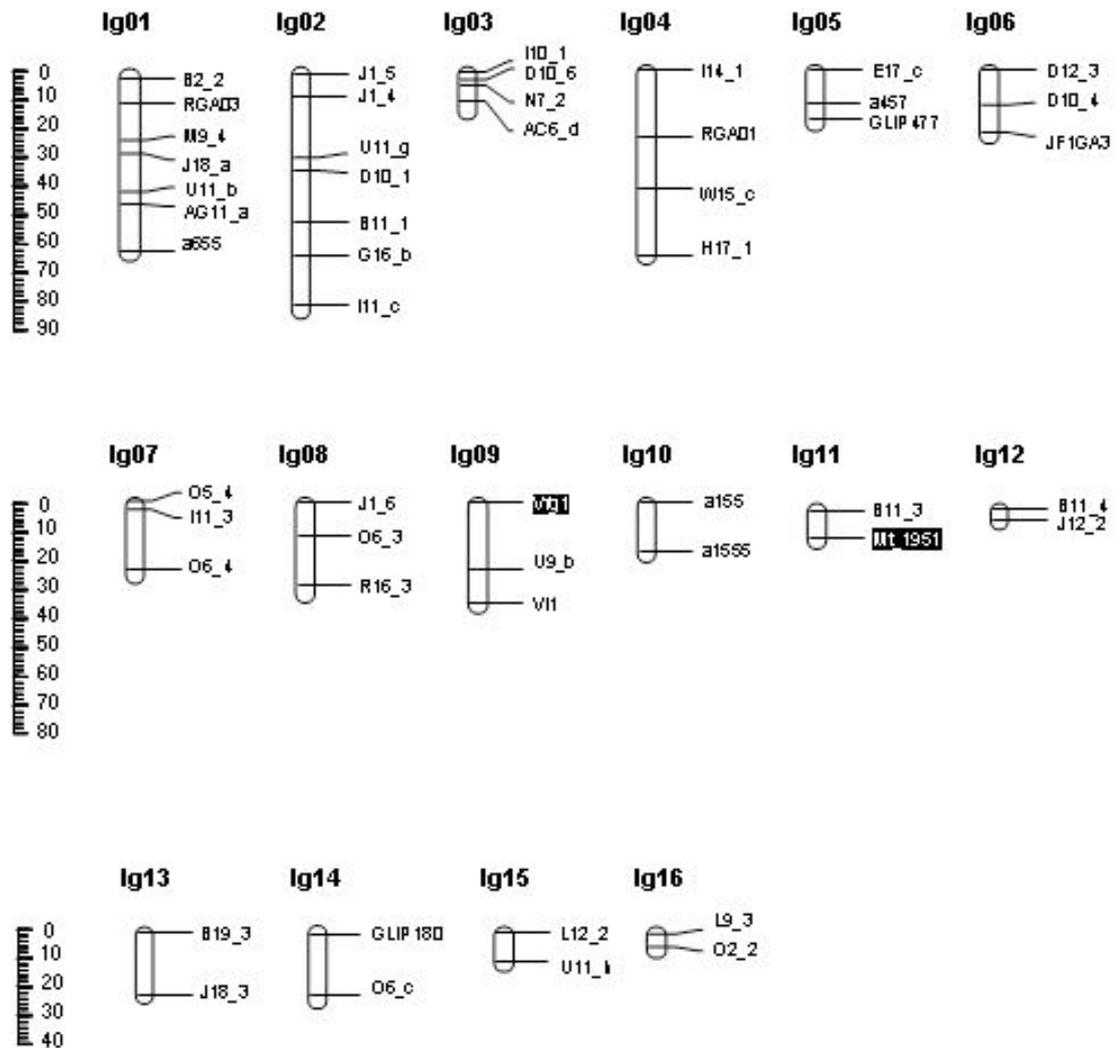


Figura 2.8. Mappa genetica della popolazione *Vj29H x Vj136*. Sono evidenziati in nero i marcatori identificati in questo lavoro.

La mappa in concreto è costituita da 178 marcatori (138 RAPD, 5 RGA, 26 EST, 6 SSR, 2 proteine di riserva, 1 isoenzima) mappati in 25 gruppi di linkage, con una distanza media tra i marcatori di 12,5 cM ed una copertura del genoma pari a 1652,2 cM. Per nove dei 25 gruppi di linkage individuati è stato possibile assegnare una specifica posizione cromosomica, in quanto presentavano marcatori comuni a gruppi di linkage già mappati e localizzati in studi precedenti. Come descritto nella tabella 2.11 è stato possibile localizzare in specifici cromosomi solo 15 dei 18 marcatori polimorfici identificati, mentre due sono risultati essere associati ai gruppi di linkage 09 e 11 (non ancora associati a nessun cromosoma) e solo uno non è stato associato a nessun cromosoma o gruppo di linkage.

Tabella 2.11. Localizzazione cromosomica dei marcatori polimorfici identificati nella popolazione *Vf29H x Vf136*. Ch: cromosoma; lg: gruppo di linkage.

marcatore molecolare polimorfico	localizzazione cromosomica	
	<i>Vf29H x Vf136</i>	
1433P	Ch II.a	
6DCS	Ch II.a	
TBB2	Ch II.b	
LG31	Ch III.a	
Lup66	Ch III.a	
VfG69	Ch V	
Mt_0757	Ch VI.a	
Mt_1130	Ch VI.a	
Mt_1109	Ch VI.a	
Lup_299	Ch VI.a	
LG68	Ch VI.a	
MMK1a	Ch VI.a	
RNAR	Ch VI.a	
HBP2	Ch VI.a	
VfG28	Ch VI.b	
VfG1	lg09	
Mt_1951	lg11	
AnMtS13	non associato	

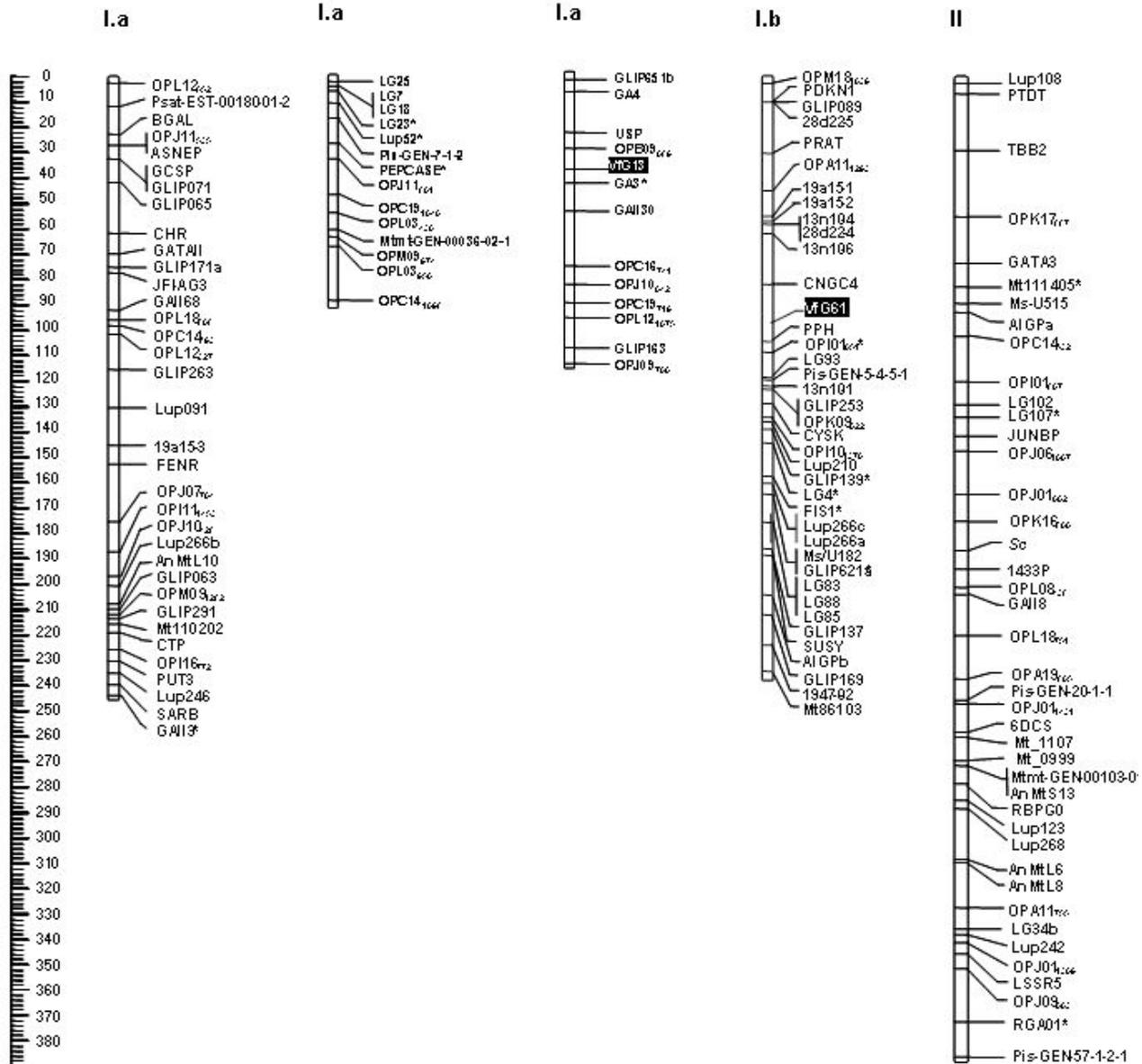
2.3.3 Marcatori molecolari polimorfici identificati nella popolazione RIL *Vf6 x Vf27*

Nella popolazione RIL F₆ *Vf6 x Vf27* sono stati individuati 4 nuovi marcatori polimorfici di tipo SSR (tabella 2.12), le cui condizioni di amplificazione ottimali sono specificate in tabella 2.4 e 2.5. In particolare tre di questi (VfG6, VfG13, AA491) mostrano un polimorfismo di tipo P/A ed uno (VfG61) un polimorfismo di tipo ALP.

Tabella 2.12. Marcatori polimorfici identificati nella popolazione *Vf6xVf27*. Sono indicati il tipo di polimorfismo identificato e la dimensione della banda polimorfica ottenuta in entrambi i parentali.

nome marcatore	tipo polimorfismo	dimensione frammento polimorfico (bp)	
		<i>Vf6</i>	<i>Vf27</i>
VfG6	P/A	325	-
VfG13	P/A	-	227
VfG61	ALP	125	107
AA491	P/A	550	-

I marcatori polimorfici individuati sono stati mappati su una mappa genetica della popolazione RIL F_6 $Vf6 \times Vf27$ ottenuta da un lavoro precedente (Serafin Isquierdo comunicazione personale). E' stata così sviluppata una nuova versione della mappa genetica che è rappresentata nella figura 2.9.



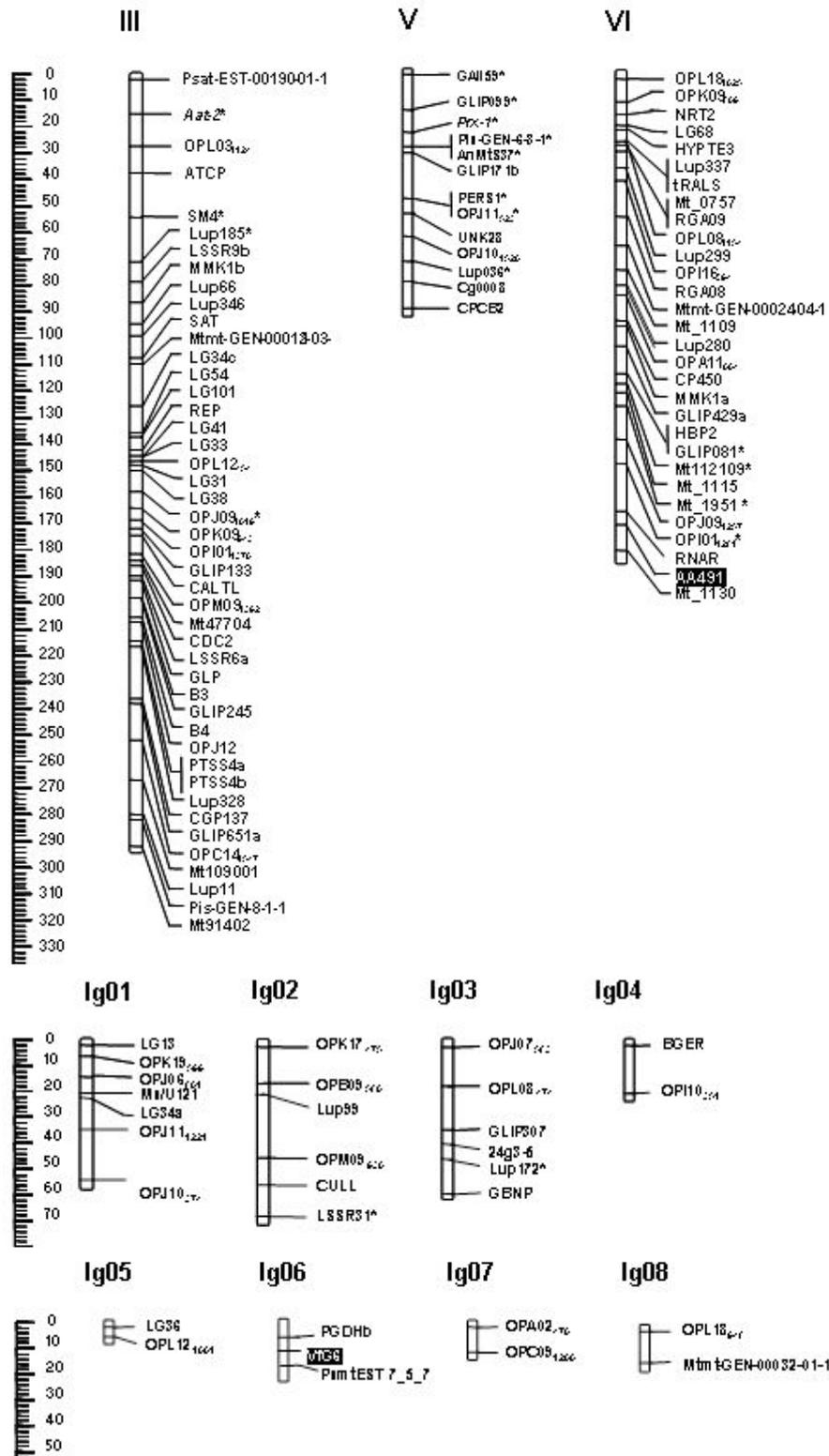


Figura 2.9. Mappa genetica della popolazione *V26 x V27*. Sono evidenziati in nero i marcatori identificati in questo lavoro.

La mappa genetica è attualmente costituita da 262 marcatori (167 EST, 71 RAPD, 15 SSR, 3 RGA, 2 proteine di riserva, 3 isoenzimi, 1 marcatore morfologico) mappati in 16 gruppi di linkage, con una distanza media tra i marcatori di 7,26 cM ed una copertura del genoma pari a 1875,1 cM. Per otto dei 16 gruppi di linkage individuati è stato possibile assegnare una specifica posizione cromosomica. Per tutti i marcatori polimorfici individuati in questo studio è stato possibile assegnare la posizione o in specifici cromosomi o gruppi di linkage (tabella 2.13).

Tabella 2.13. Localizzazione cromosomica dei marcatori polimorfici identificati nella popolazione *Vf6xVf27*. Ch: cromosoma; lg: gruppo di linkage.

marcatore molecolare polimorfico	localizzazione cromosomica
	<i>Vf6 x Vf27</i>
VfG13	Ch I a
VfG61	Ch I b
AA491	Ch VI
VfG6	lg 06

2.3.4 Analisi dei QTL associati alla resistenza ad *Ascochyta fabae* nella popolazione RIL Vf6 x Vf136

Nella mappa genetica della popolazione RIL F₆ Vf6 x Vf136 è stato possibile riconfermare, mediante l'analisi statistica descritta nel paragrafo 2.2.3.2, la presenza di due QTL di resistenza ad *A. fabae* (*Af1* e *Af2*) sui cromosomi II.a e III.a (figura 2.10). Tali QTL erano stati precedentemente individuati in un lavoro effettuato da Diaz-Ruiz e collaboratori (2009).

E' stato possibile calcolare che i due QTL *Af1* e *Af2*, che controllano il carattere DSL (disease severity on leaves), insieme esprimono il 23% della variabilità fenotipica totale (tabella 2.14). In particolare, il QTL *Af1*, localizzato nel cromosoma 3 esprime il 10% della variabilità fenotipica totale mostrando un effetto additivo pari a 1.11 ed un valore di LOD pari a 4.73. Nel caso del QTL *Af2*, localizzato nel cromosoma 2, esso è responsabile del 13% della variabilità fenotipica totale con un effetto additivo pari a 1.21 ed un valore di LOD pari a 5.74.

Per quanto riguarda il carattere DSS (disease severity on stem) sono stati identificati gli stessi QTL *Af1* e *Af2* identificati per il carattere DSL. In questo caso *Af1* e *Af2* esprimono complessivamente il 18% della variabilità fenotipica totale. In particolare *Af1* ne esprime l'8% con un effetto additivo pari a 2.8 ed un LOD di 3.51, mentre *Af2* ne esprime il 10% con un effetto additivo pari a 3.3 ed un LOD di 4.11.

Tabella 2.14. QTL di resistenza ad *Ascochyta fabae* individuati nella popolazione RIL F₆ Vf6xVf136 attraverso l'analisi del composite interval mapping (CIM). DSL, disease severity on leaf; DSS, disease severity on stem; LOD, valore massimo del test statistico LOD; Add, effetto additivo; R², proporzione della variabilità fenotipica espressa dal rispettivo QTL.

QTL	Carattere Quantitativo	Localizzazione Cromosomica	Add	Marcatori Fiancheggiati	LOD	R ²
<i>Af1</i>	DSL	III.A	-1,11	OPZ82	4,73	0,10
<i>Af1</i>	DSS	III.A	-2,82	OPZ82	3,51	0,08
<i>Af2</i>	DSL	II.A	-1,21	OPAG05_7377/Mer04_790	5,74	0,13
<i>Af2</i>	DSS	II.A	-3,32	OPD12_425/OPE17_1326	4,11	0,10

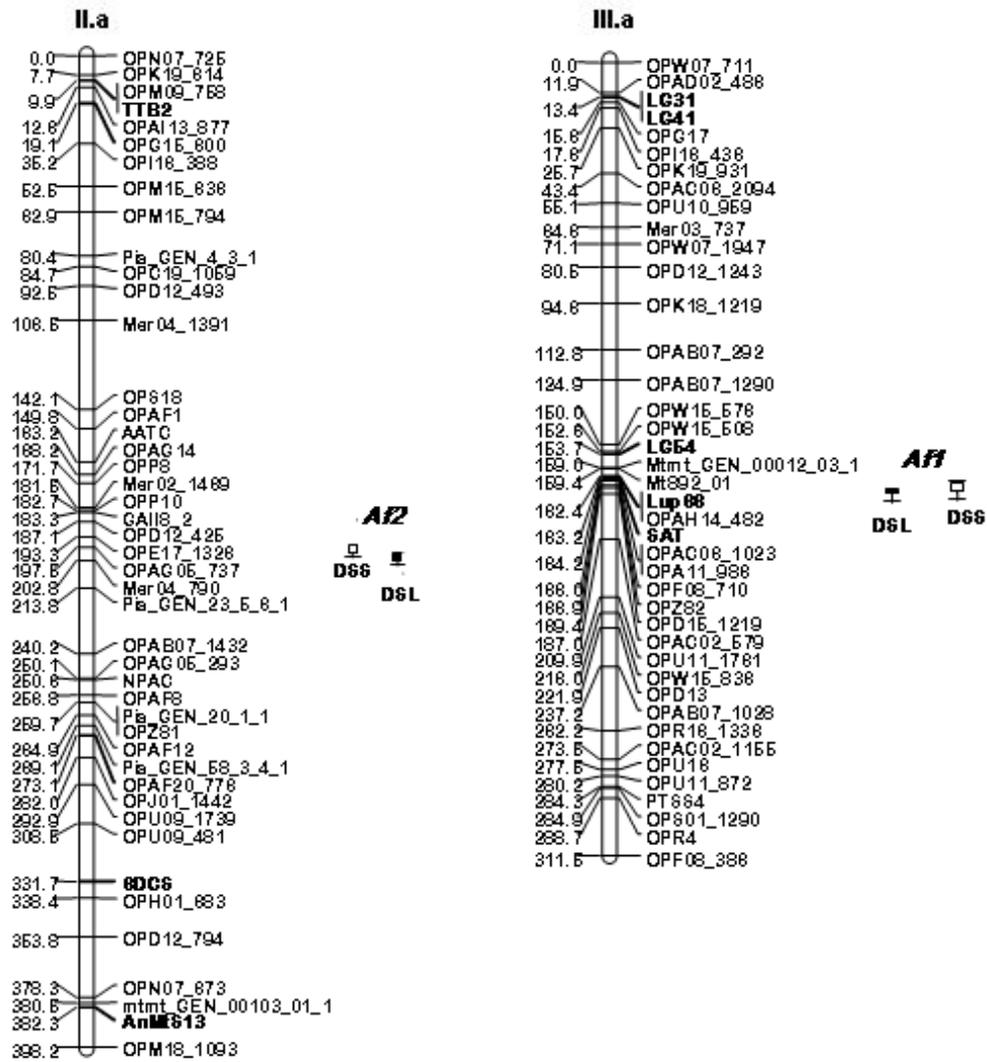


Figura 2.10. Localizzazione cromosomica dei QTL *Af1* DSL/DSS e *Af2* DSL/DSS nella mappa genetica della popolazione *Vf6* x *Vf136*. Sono evidenziati in grassetto i marcatori molecolari individuati in questo lavoro.

2.4 Discussione

Come in molte altre leguminose, gli studi genetici in *V. faba* sono resi difficili da vari tipi di ostacoli, tra cui la presenza di un genoma di grandi dimensioni (più di 12,000 Mbp), l'abbondanza di DNA ripetitivo, la difficoltà di trasformare geneticamente questa specie, e fino ad ora il ridotto investimento in studi genomici. L'insieme di questi fattori ha reso difficile lo sviluppo di marcatori molecolari e mappe genetiche in questa specie. Basti pensare che l'elevato numero di regioni ripetute riduce la possibilità di ottenere prodotti di amplificazione unici, una condizione necessaria quando si lavora con alcuni tipi di marcatori molecolari e che quindi impoverisce l'arsenale di tecniche molecolari che possono essere impiegate per ritrovare sequenze polimorfiche. Negli ultimi anni, molti studi molecolari sono stati aiutati dalle conoscenze genomiche e dalle informazioni esistenti in specie modello che, nelle leguminose, sono stati focalizzati fondamentalmente in: *M. truncatula*, *L. japonicus*, *G. max*, *P. sativum* e *P. vulgaris*. L'utilizzo di queste informazioni può facilitare notevolmente eventuali studi di caratterizzazione genetica, sviluppo di mappe comparative (mediante trasferimento di marcatori molecolari), individuazione di QTL e clonaggio di geni di interesse (Salvi e Tuberosa, 2006) in specie non modello come *V. faba*.

Ad ora, i marcatori molecolari più facilmente trasferibili da una specie ad un'altra sono i marcatori microsatelliti o SSR (*Simple Sequence Repeats*) ed i marcatori derivati da sequenze EST, basati sull'identificazione di SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Essi, infatti, godono di un elevato tasso di riproducibilità ed affidabilità.

Per le suddette ragioni in questo lavoro abbiamo utilizzato sia marcatori SSR precedentemente sviluppati nella specie modello *P. sativum* (Loridon *et al.*, 2005) ed in altre cultivar di *V. faba* (Zeid *et al.*, 2009), che marcatori derivati da EST sviluppati nel corso di studi effettuati in *M. truncatula* ed altre specie di leguminose (Ellwood *et al.*, 2008), al fine di trasferirli in tre differenti popolazioni RIL F₆ (*Vf6 x Vf136*, *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf27*) i cui parentali mostravano un differente livello di resistenza nei confronti del patogeno *A. fabae*. Tra i marcatori polimorfici trasferiti nelle tre popolazioni RIL utilizzate, i marcatori derivati da

EST hanno mostrato un tasso di trasferibilità più alto (82%) rispetto a quelli di tipo SSR (18%). I risultati da noi ottenuti concordano con quanto osservato in lavori precedenti, dove si riduceva notevolmente la percentuale di trasferibilità dei marcatori SSR quando si passava da piante appartenenti allo stesso genere a piante di generi differenti. Un esempio è fornito da Peakell e collaboratori (1998) i quali utilizzarono marcatori SSR sviluppati in *G. max* ed ottennero circa un 65% di amplificazione inter-specifica all'interno e del 3-13% al livello intergenerico. Risultati simili furono ottenuti da Choumane e collaboratori (2000) i quali osservarono un elevato grado di conservazione di SSR sviluppati in cece tra varie specie appartenenti al genere *Cicer*. La consapevolezza dei limiti legati alla trasferibilità dei marcatori SSR a livello intergenerico ha portato a preferire l'utilizzo di marcatori EST piuttosto che microsatelliti nei più recenti lavori di mappaggio comparativo. Nel 2008, infatti, Ellwood e collaboratori hanno prodotto la prima mappa genetica di *V. faba* (usando una popolazione RIL F₆ ottenuta dall'incrocio tra le linee *Vf6* e *Vf27*) costituita esclusivamente da marcatori EST precedentemente sviluppati in differenti specie di leguminose. Gli stessi marcatori sono stati utilizzati anche da noi nel tentativo di trasferirli ad altre due popolazioni RIL F₆ di *V. faba*, ottenute dagli incroci *Vf6* x *Vf136* e *Vf29H* x *Vf136*. Per tutti i marcatori derivati da EST analizzati (38) è stato possibile individuare un prodotto di amplificazione specifico nei 4 parentali. Solo 21 di essi (55,2%) generavano però un frammento polimorfico tra i parentali di uno o di entrambi gli incroci. In particolare dei 21 marcatori polimorfici otto appartengono al gruppo MP (corrispondente al 53% dei marcatori MP analizzati), sei al gruppo MLG (corrispondente al 66% dei marcatori MLG analizzati), tre al gruppo ML (corrispondente al 50% dei marcatori ML analizzati) e quattro al gruppo GLIP (corrispondente al 50% dei marcatori GLIP analizzati). Si è quindi osservata una maggiore percentuale di trasferibilità tra le varie popolazioni RIL analizzate dei marcatori appartenenti ai gruppi MLG e MP. Tali dati concordano con quanto osservato da Ellwood e collaboratori (2008) e da Phan e collaboratori (2007) riguardo la trasferibilità di questi gruppi di marcatori a *V. faba* e *L. culinaris*, rispettivamente. Ciò può essere spiegato dal fatto che tali gruppi di marcatori sono spesso basati sull'omologia di più di due specie distanti filogeneticamente, per cui possiedono una maggiore probabilità di risultare trasferibili e polimorfici in

differenti specie di leguminose. Infatti, il diverso grado di trasferibilità dei marcatori molecolari costruiti su sequenze espresse può essere attribuito a diversi fattori tra cui: omologie di sequenza di regioni trascritte presenti nel genoma di differenti specie, il grado ed il periodo di diversificazione dei geni (può differire tra diverse specie dato che un locus può variare più velocemente di altri), e la stabilità della regione genomica (Ilic *et al.*, 2003).

Dei 38 marcatori derivati da EST saggiati sei sono risultati polimorfici solo nella popolazione derivante dall'incrocio *Vf6 x Vf136*, tre solo in quella derivante dall'incrocio *Vf29H x Vf136*. Dodici sono invece risultati polimorfici in entrambe le popolazioni derivanti dagli incroci *Vf6 x Vf136* e *Vf29H x Vf136* (tabella 2.15). Nella tabella 2.15 è possibile osservare che i 12 marcatori comuni alle popolazioni *Vf6 x Vf136* e *Vf29H x Vf136* possiedono la stessa localizzazione cromosomica, fatta eccezione per il solo Mt_1951. Per quest'ultimo, Ellwood e collaboratori (2008) identificarono due locus polimorfici (Mt_1951a e Mt_1951b) associati ai cromosomi I.b e VI, rispettivamente. Per cui la localizzazione da noi ottenuta per questo marcatore nelle mappe genetiche delle popolazioni *Vf6 x Vf136* e *Vf29H x Vf136* sul cromosoma I.b e sul gruppo di linkage lg11, rispettivamente, può essere dovuta all'amplificazione di solo uno dei due possibili locus polimorfici (Mt_1951a).

Tabella 2.15. Localizzazione cromosomica dei marcatori EST nelle popolazioni F₆ *Vf6 x Vf136*, *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf27*. n.p.: non polimorfico; Ch: cromosoma; lg: linkage group.

marcatore molecolare polimorfico	localizzazione cromosomica		
	<i>Vf29H x Vf136</i>	<i>Vf6 x Vf136</i>	<i>Vf6 x Vf27</i>
1433P	Ch II.a	n.p.	Ch II
6DCS	Ch II.a	Ch II.a	Ch II
AIGPb	n.p.	Ch I.b	Ch I.b
AnMtS13	non associato	Ch II.a	Ch II
HBP2	Ch VI.a	non associato	Ch. VI
LG31	Ch III.a	Ch IIIa	Ch III
LG41	n.p.	Ch IIIa	Ch III
LG54	n.p.	Ch IIIa	Ch III
LG68	Ch VI.a	Ch VI.a	Ch VI
LSSR9	n.p.	non associato	Ch III
Lup 299	Ch VI.a	Ch VI.a	Ch VI
Lup280	n.p.	Ch VI.a	Ch VI
Lup66	Ch III.a	Ch III.a	Ch III
MMK1a	Ch VI.a	n.p.	Ch VI
Mt_0757	Ch VI.a	Ch VI.a	Ch VI
Mt_1109	Ch VI.a	Ch VI.a	Ch VI
Mt_1130	Ch VI.a	Ch VI.b	Ch VI
Mt_1951	Ig11	Ch I.b	Ch VI
RNAR	Ch VI.a	n.p.	Ch VI
SAT	n.p.	Ch III.a	Ch III
TBB2	Ch II.b	Ch II.a	Ch II

Dalla comparazione dei dati ottenuti con i risultati pubblicati da Ellwood e collaboratori (2008) per la popolazione *Vf6 x Vf27* è stato possibile confermare che nella maggior parte dei casi i marcatori presi in esame possiedono la stessa localizzazione cromosomica nelle tre mappe genetiche ottenute. Ciò avvala l'ipotesi (Choi *et al.*, 2006) che la costruzione di marcatori molecolari in corrispondenza di regioni altamente conservate di sequenze EST (come ad esempio regioni introniche o microsatelliti) li renda altamente trasferibili ed utilizzabili come marcatori ponte nell'allineamento di differenti mappe genetiche. Alcuni esempi dell'utilità dei marcatori EST e microsatelliti in quest'ambito sono stati forniti da vari lavori in cui sono stati impiegati questo tipo di marcatori per l'allineamento inter ed intra-specifico di mappe genetiche di varie popolazioni di sorgo (Feltus *et al.*, 2006, Wu e Huang 2007) e tra varie altre specie di leguminose (Choi *et al.*, 2004b, Nelson *et al.*, 2006, Phan *et al.*, 2007a, Phan *et al.*, 2007b., Zhu *et al.*, 2005, Aubert *et al.*, 2006, Choi *et al.*, 2006).

I marcatori molecolari individuati in questo lavoro hanno permesso di incrementare il grado di saturazione delle mappe genetiche delle popolazioni *Vf6 x Vf136* (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009), *Vf29H x Vf136* (Avila *et al.*, 2004; Carmen Avila, comunicazione personale) e *Vf6 x Vf27* (Serafin Cruz-Isquierdo, comunicazione personale) preesistenti di *V. faba*. Nella tabella 2.16 sono state confrontate e

riassunte le caratteristiche delle nuove mappe genetiche così ottenute, relativamente alla copertura del genoma, il numero di gruppi di linkage, il numero di marcatori associati e la distanza media tra i marcatori, rispetto a quelle preesistenti. E' possibile osservare che in tutte le mappe genetiche indicate, il numero dei gruppi di linkage (che varia da 16 a 25) è molto superiore al numero dei cromosomi presenti in fava (n=6) (tabella 2.16). In particolare, la mappa della popolazione *Vf29H x Vf136* è quella che presenta il maggior numero di gruppi di linkage (25). Tre di questi (lg04, lg06 e lg11) presentano ciascuno un marcatore (RGA01, JF1GA3 e Mt_1951) in comune con la mappa della popolazione *Vf6 x Vf136*. La localizzazione di questi marcatori sui cromosomi II.b, I.a e I.b della mappa relativa alla popolazione *Vf6 x Vf136* potrebbe consentire l'attribuzione dei gruppi di linkage lg04, lg06 e lg11 ai citati cromosomi della popolazione *Vf29H x Vf136*. Come già descritto in questo lavoro, la difficoltà nell'unire tutti i gruppi di linkage appartenenti allo stesso cromosoma può essere causata dalle grandi dimensioni che caratterizza il genoma di *V. faba* e dalla relativa saturazione delle mappe disponibili finora.

Tabella 2.16. Caratteristiche delle mappe genetiche delle popolazioni F₆ *Vf6 x Vf136*, *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf27* ottenute in questo ed in precedenti lavori. d.m.m.: distanza media tra i marcatori; n.d.: non determinato.

popolazione	copertura genoma (cM)	n° gruppi di linkage	n° marcatori	d.m.m. (cM)	referenza
<i>Vf6 x Vf136</i>	2856,7	21	317	12,72	Diaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2009
	3096,3	21	335	11,82	attuale
<i>Vf29H x Vf136</i>	1308	18	103	n.d.	Avila <i>et al.</i> , 2004
	1652,2	25	178	12,5	attuale
<i>Vf6 x Vf27</i>	1875,1	16	262	7,26	Serafin Cruz-Izquierdo, comunicazione personale

Uno dei vantaggi associati alla saturazione di una mappa genetica consiste nell'aumento della precisione con la quale si possono localizzare i QTL all'interno di un cromosoma.

Nella popolazione F₂ derivante dall'incrocio *Vf6 x Vf136* Roman e collaboratori (2003) avevano, infatti, identificato i QTL di resistenza ad *A. fabae Afl* ed *Af2*, localizzati rispettivamente nei cromosomi III.a e II.a. Successivamente Diaz-Ruiz e collaboratori (2009) utilizzando una popolazione inbred F₆ derivante dallo stesso incrocio furono in grado di localizzare tali QTL sui cromosomi III.a e II.a con maggiore accuratezza. L'intervallo di confidenza dei QTL misurato per le due

regioni genomiche identificate nella F₂ risultava difatti chiaramente ridotto nella popolazione F₆.

Nel nostro lavoro, grazie all'aggiunta di un cospicuo numero di marcatori, è stato possibile saturare ulteriormente le regioni cromosomiche relative ai QTL *Af1* e *Af2*. Sono infatti stati inseriti marcatori più strettamente associati a tali regioni permettendo da un lato di confermare la localizzazione cromosomica dei QTL di resistenza ad *A. fabae* e dall'altro di ridurre l'ampiezza della regione cromosomica all'interno della quale si localizzano gli stessi QTL.

Nella figura 2.11 è possibile osservare che nella mappa da noi ottenuta il QTL *Af1* è localizzato sul cromosoma III.a, come era stato precedentemente descritto sia per la popolazione F₂ che per la RIL F₆ (Ramon *et al.*, 2003; Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). In aggiunta la mappa attuale è stata arricchita dalla presenza di 13 nuovi marcatori localizzati sul cromosoma III.a, che si sommano ai 28 marcatori preesistenti nella mappa pubblicata da Diaz-Ruiz e collaboratori (2009). Questi ultimi hanno reso possibile la comparazione di regioni omologhe presenti in vari gruppi di linkage delle due mappe. E' inoltre possibile osservare che nella mappa attuale l'intervallo di confidenza si è notevolmente ridotto (figura 2.11).

Nella nuova mappa relativa alla popolazione *Vf6 x Vf136* è stato anche possibile confermare la localizzazione del QTL *Af2* (figura 2.11). L'aggiunta di 13 nuovi marcatori ha permesso di aumentare il grado di saturazione del cromosoma II.a. In questo caso 32 marcatori comuni alla mappa precedente hanno permesso la comparazione della regione omologa tra i gruppi di linkage. Anche in questo caso l'intervallo di confidenza si è ridotto (figura 2.11). Nella tabella 2.17 sono messi a confronto i marcatori fiancheggianti il QTL, i valori di LOD ed i valori dell'effetto additivo di ciascun QTL osservati nei tre studi. In tutte le generazioni e per i due QTL identificati gli alleli di resistenza sono associati al parentale resistente (*Vf6*), come dimostrano i valori negativi dell'effetto additivo (tabella 2.17).

Otto dei marcatori che hanno contribuito al processo di saturazione dei cromosomi II.a e III.a sono marcatori derivati da sequenze EST sviluppati in questo lavoro di dottorato. In particolare LG54, Lup66 e SAT sono localizzati nelle vicinanze del QTL *Af1*. Il prodotto di amplificazione del marcatore LG54 presenta omologia di sequenza con una proteina G che contenente un dominio di

legame all'RNA, che sembra essere implicata in diversi processi cellulari tra i quali l'apoptosi (Akiyama *et al.*, 2001). I marcatori Lup66 e SAT presentano invece omologia di sequenza con l'alfa-tubulina e la solfatoadenililtransferasi, rispettivamente.

Tabella 2.17. Comparazione dei QTL di resistenza ad *Ascochyta fabae* nelle popolazioni F₂ e RIL F₆ ottenute dall'incrocio delle linee *Vf6* e *Vf136*. DSL, disease severity on leaf; DSS, disease severity on stem; LOD, valore

carattere	QTL	localizzazione cromosomica	popolazione	marcatori fiancheggianti	LOD	add	referenza
Resistenza ad <i>A. fabae</i>	<i>Af1</i>	III a	<i>VfoxVf136</i> (RIL F ₆)	OPN071529/OPK03921 OPE171372/OP118626 OPAC061023 OPF08710 OPA.G05737/Mer04790 OPD12425/OPE171326 OPZ82 OPZ82 OPA.G05737/Mer04790 OPD12425/OPE171326	8.68	-2.2	Roman <i>et al.</i> , 2003 Diaz <i>et al.</i> , 2009 attuale
	<i>Af2</i>	II a1/a2			6.24	-1.26	
	<i>Af1</i> (DSL)	III a			4.2	-1.07	
	<i>Af1</i> (DSS)	III a			3.25	-2.76	
	<i>Af2</i> (DSL)	II a			5.88	-1.28	
	<i>Af2</i> (DSS)	II a			3.84	-3.21	
	<i>Af1</i> (DSL)	III a			4.73	-1.11	
	<i>Af1</i> (DSS)	III a			3.51	-2.81	
	<i>Af2</i> (DSL)	II a			5.74	-1.21	
	<i>Af2</i> (DSS)	II a			4.11	-3.32	

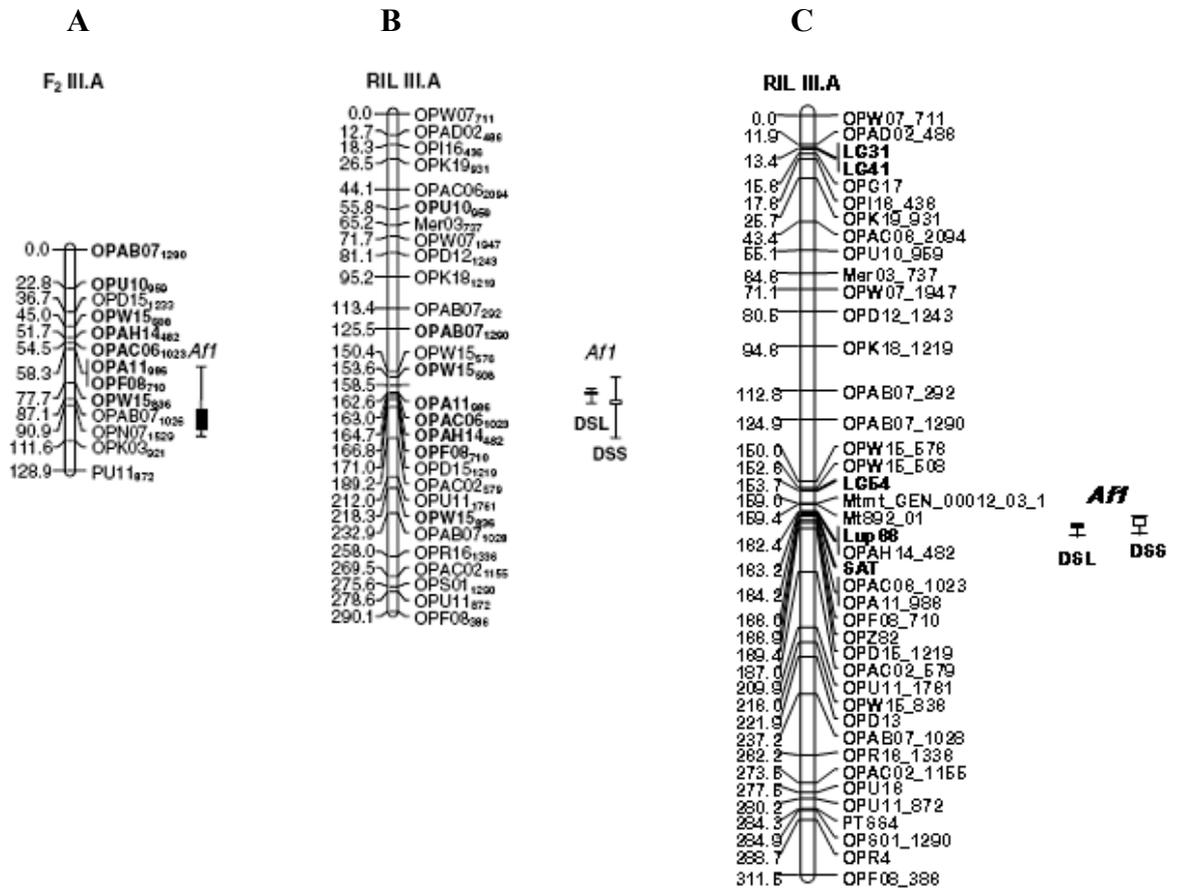
I risultati ottenuti dall'analisi dei QTL associati alla resistenza ad *A. fabae* sono in accordo con la teoria (Moreno-Gonzales, 1993) secondo cui le linee RIL rappresentano uno strumento più potente, rispetto alle linee F_{2,3}, per la individuazione e risoluzione dei QTL, poichè in esse avvengono eventi di ricombinazione addizionali.

Per quanto riguarda la popolazione *Vf29H x Vf136*, Avila e collaboratori (2004) individuarono sei QTL associati alla resistenza ad *A. faba* nella popolazione F₂. La localizzazione di tali QTL nella popolazione RIL F₆ è attualmente in corso. Nel caso invece della popolazione *Vf6 x Vf27* non è stata mai riscontrata una differenza fenotipica significativa tra i due parentali relativamente al carattere di resistenza verso *A. fabae*, per cui l'analisi dei QTL non è mai stata effettuata.

Il ritrovamento di QTL comuni a più di una popolazione potrebbe significare che il meccanismo di resistenza in differenti background genetici sia simile o che un meccanismo di difesa generale possa determinare questo tipo di resistenza in *V. faba*. Inoltre, questi QTL risultano essere di grande importanza per futuri utilizzi in programmi di MAS poichè essendo presenti in diversi fonti di resistenza possono essere potenzialmente funzionanti in vari background genetici.

Tali studi preliminari mostrano l'enorme potenziale nell'utilizzo di marcatori molecolari EST per saturare le mappe genetiche al fine di identificare geni potenzialmente associati a caratteri di interesse ed in questo caso specifico alla resistenza ad *A. fabae*. L'ulteriore saturazione di mappe genetiche, soprattutto nelle regioni ove sono presenti i QTL, potrebbe portare alla identificazione di potenziali geni candidati e allo sviluppo di marcatori molecolari utili in programmi di miglioramento genetico assistito (MAS). L'identificazione di un gene target potrebbe inoltre facilitare lo sviluppo di marcatori diagnostici che possono essere efficacemente utilizzati in approcci di MAS per il piramidaggio di diversi loci di resistenza e quindi ottenere cultivar di fava che mostrino una forte e duratura resistenza verso *A. fabae*. In aggiunta a questa applicazione, la saturazione delle mappe genetiche effettuata in questo studio consentirà lo sviluppo di una mappa genetica composta di fava. La nuova mappa così ottenuta rappresenterà un punto di riferimento per futuri utilizzi delle informazioni genomiche e genetiche nel mappaggio comparativo di fava. Come descritto precedentemente, tale approccio è utile nell'identificazione di geni candidati

presenti in specifici QTL e nella validazione dei QTL in diversi fondi genetici e tra diverse specie di leguminose.



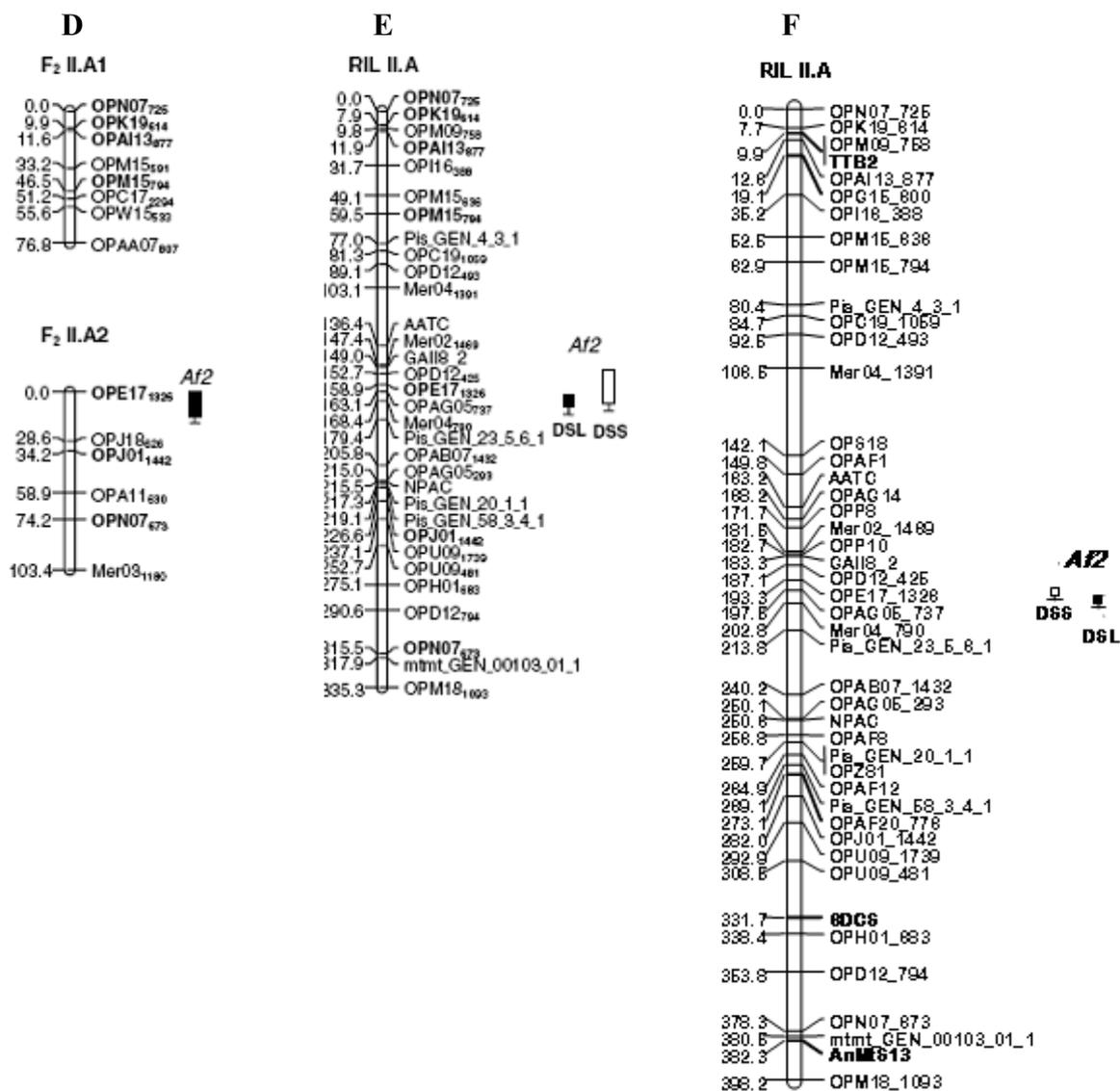


Figura 2.11. Comparazione dei QTL di resistenza a *Ascochyta fabae* tra diverse mappe della popolazione *Vf6 x Vf136* (F₂ e RIL F₆). A, D: mappa elaborata da Roman e collaboratori (2003); B, E: mappa elaborata da Diaz-Ruiz e collaboratori (2009); C, F: mappa elaborata durante il lavoro di tesi (sono evidenziati in grassetto i marcatori individuati in questo lavoro).

La barra indica la localizzazione del QTL. L'intervallo di confidenza 1-LOD e 2-LOD sono indicati con la barra piena e la linea semplice, rispettivamente, basandosi sui risultati ottenuti col metodo CIM (composite interval mapping).

3 Identificazione di geni espressi durante l'interazione *Ralstonia solanacearum* – *Solanum tuberosum*

3.1 Introduzione

3.1.1 Ralstonia solanacearum

Ralstonia solanacearum è un batterio Gram-negativo a forma bastoncellare, lungo 0,5-1,5 µm, con un singolo flagello polare. Si distingue da *Erwinia* per la reazione positiva alla colorazione di granuli di poli-β-idrossibutirato con Sudan Black-B o Nile Blue, inoltre si colora intensamente ai poli con carbolfucsina. Le colonie in agar sono inizialmente lisce, brillanti ed opalescenti, ma con il tempo diventano marroni (Lelliott *et al.*, 1987; Saddler, 1994).

Il batterio fitopatogeno fu descritto per la prima volta come *Bacillus solanacearum* da Smith nel 1896 (OEPP/EPPO Bulletin, 2004), in seguito fu assegnato al genere *Pseudomonas*, prima che studi più approfonditi su alcune specie non-fluorescenti del genere *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992) portarono alla identificazione del genere *Burkholderia*, all'interno del quale fu catalogato il batterio con il nome di *Burkholderia solanacearum*. Successive indagini su questo genere, infine, hanno rilevato che *Burkholderia solanacearum* era sufficientemente distinta dagli altri membri del genere per giustificarne la sua assegnazione al recente genere proposto *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Dato che la classificazione del batterio ha subito diverse revisioni nel corso degli anni, in letteratura è possibile ritrovarlo con i sinonimi di *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester, *Burkholderia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1992), *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith.

L'attuale classificazione tassonomica del batterio è la seguente:

- REGNO: *Procaryotae*
- DIVISIONE: *Gracilicutes*
- CLASSE: *Proteobacteria* sottodivisione β

- FAMIGLIA: *Pseudomonadaceae*
- GENERE: *Ralstonia*
- SPECIE: *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1995) è un batterio fitopatogeno che complessivamente presenta un range di ospiti estremamente ampio, anche se le differenti razze in cui si suddivide possono mostrare range di ospiti molto limitati. Nel corso degli anni, con il susseguirsi degli studi sono state descritte almeno 5 razze e 5 biovar (Buddenhagen *et al.*, 1962).

La razza 1 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C) attacca tabacco, pomodoro, patata, melanzana, banano diploide e numerose altre colture ed erbe spontanee dell'area tropicale. La razza 2 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C), tipica delle aree tropicali del Sud America, attacca banano triploide (causando il così detto "Moko") e *Heliconia spp*, ma si ritrova anche nelle Filippine dove causa il "bugtok" del plantano. La razza 3 (temperatura ottimale di crescita di 27°C) si ritrova nelle alture delle zone tropicali e subtropicali nonché nei climi temperati, attacca principalmente patata e pomodoro, non mostrando elevata virulenza nei confronti delle altre Solanacee. Altri ospiti sono le erbe spontanee *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Solanum cinereum* (in Australia), la composita *Melampodium perfoliatum* (in Costa Rica) e *Pelargonium hortorum*. Spesso si ritrova in maniera non sintomatica su specie selvatiche non appartenenti alla famiglia delle Solanacee (Pradhanang *et al.*, 2000; Strider *et al.*, 1981; Wenneker *et al.*, 1999; Janse *et al.*, 2004). La razza 4 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C) è particolarmente aggressiva nei confronti dello zenzero e la razza 5 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C) è specializzata nei confronti del genere *Morus spp*.

La razza 3, capace di crescere a temperature relativamente più basse (27°C), è quella potenzialmente più pericolosa per i paesi dell'Europa e dell'area mediterranea, dove potrebbe adattarsi e diffondersi in maniera stabile. In seguito alle segnalazioni di tale razza avutesi negli anni novanta, sono stati emanati nei vari paesi dei decreti di lotta obbligatoria e dove si effettuano controlli scrupolosi sulle importazioni di materiale potenzialmente pericoloso (EPPO/CABI, 1996).

In Italia il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali ha emanato il Decreto Ministeriale 23 febbraio 2000, recepimento della direttiva n. 98/57/CE del Consiglio concernente la lotta contro *R. solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.*, 1995).

3.1.2 *L'avvizzimento batterico della patata: meccanismo della malattia e sintomatologia*

L'avvizzimento batterico causato da *R. solanacearum* (figura 3.1) fu descritto per la prima volta alla fine del XIX secolo su patata, tabacco, pomodoro ed arachide in Asia, America del nord e Sud America (OEPP/EPPO Bulletin, 2004).

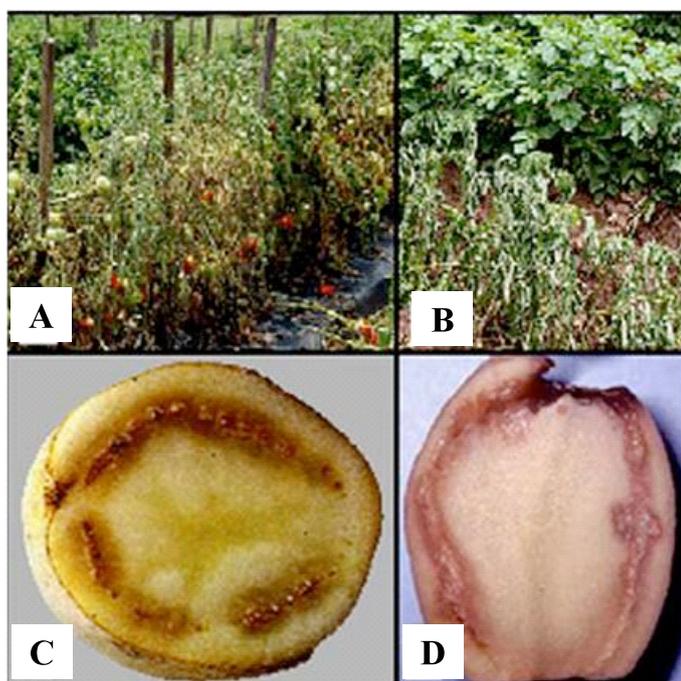


Figura 3.1. **A:** sintomatologia della malattia su pomodoro; **B:** sintomatologia della malattia su patata; **C e D:** tuberi infetti.

Si tratta di una malattia sistemica particolarmente dannosa nelle zone a clima caldo e umido. La penetrazione nella pianta avviene, tipicamente, attraverso ferite provocate sugli organi ipogei dagli strumenti di lavorazione del terreno, da insetti o nematodi fitofagi, da infezioni fungine o da altre cause naturali e non (ad es. nel punto di origine delle radici secondarie). L'infezione è comunque possibile anche attraverso soluzioni di continuità aperte sulle parti aeree della pianta. Penetrato nell'ospite, il batterio raggiunge le strutture xilematiche, attraverso le quali si

diffonde in tutte le direzioni. Lo sviluppo della malattia è favorito da elevata umidità del terreno e da temperature superiori a 20°C (Matta A., 1996).

La colonizzazione sistemica dei tessuti vascolari dell'ospite richiede la produzione, da parte di *R. solanacearum*, di polisaccaridi extracellulari ad alto peso molecolare (EPS) e di numerose proteine extracellulari (EXPs) (Schell, 2000), che finiscono per occludere lo xilema.

Sono stati effettuati studi *in planta* con mutanti di *Ralstonia* in cui non veniva più espresso il gene codificante per EPS I (Denny e Baek 1991; Orgambide *et al* 1991; McGarvey *et al* 1999). Tali mutanti sembravano essere quasi avirulenti non riuscendo più a colonizzare i vasi xilematici della pianta. Ciò suggerisce il ruolo che tale molecola ha nell'ostruire fisicamente il sistema vascolare ed alterare il movimento dell'acqua, causando l'appassimento nelle piante infettate (Genin e Boucher 2002). Sono state ipotizzate altre funzioni per gli EPS prodotti da *Ralstonia*. Ad esempio sembrano partecipare alla formazione di un biofilm sulla superficie dei vasi xilematici durante lo sviluppo della malattia, sembrano aiutare il batterio a sopravvivere nel suolo, lontano dalla pianta ospite, durante periodi di siccità e all'antibiosi, proteggerlo dalle risposte di difesa della pianta coprendo la sua superficie ed impedendone il riconoscimento da parte dell'ospite (McGarvey *et al.*, 1999; Genin e Boucher 2002; Denny 1995).

R. solanacearum, oltre agli EPS, secreta vari enzimi in grado di degradare la parete cellulare delle piante (CWDEs), tra questi vi sono tre poligalatturonasi (PehA, PehB e PehC) (Huang e Allen, 1997; Schell *et al.*, 1988), una endoglucanasi (Egl) (Roberts *et al.*, 1988), una pectin-metilesterasi (Pme) (Tans-Kersten *et al.*, 1998), e una cellobioidrolasi (CbhA). Tuttavia, analisi molecolari hanno dimostrato che il ruolo di ciascuno degli enzimi sopra riportati è secondario nel determinare l'avvizzimento batterico delle piante (Genin e Boucher., 2002).

Alcune proteine EXPs, come gli enzimi che attaccano la parete cellulare, vengono secrete attraverso il sistema di secrezione di tipo II (T2SS) (Denny e Baek., 1991; Huang e Allen 1997 e 2000; Tans-Kersten *et al.*, 1998), intensificando il tasso e la severità dell'appassimento. Altre proteine EXPs, che hanno un ruolo meno chiaro nella patogenesi e nel provocare la risposta difensiva delle piante, sono trasportate nelle cellule dell'ospite attraverso un sistema di secrezione di tipo III (T3SS) (van Gijsegem *et al.*, 1995; Cornelis *et al.*, 2000).

Gli *hrp* sono i geni codificanti per le proteine strutturali del sistema di secrezione di tipo III regolati attraverso una complessa cascata di trasduzione di segnale (Hikichi *et al* 2007). Nei primi stadi della malattia, a bassa concentrazione del patogeno, si verifica l'interazione fisica tra il batterio e la cellula della pianta. Il riconoscimento della cellula della pianta è mediato dal recettore di membrana PrhA: tale interazione attiva l'espressione del gene *HrpB* attraverso una cascata di trasduzione del segnale via PrhA-PrhR/PrhI-PrhJ-HrpG (Aldon *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 1999 & 2002; Cunnac *et al.*, 2004). Il gene *HrpB* è un regolatore della trascrizione ed attiva i geni *hrp* e quindi la formazione del sistema di secrezione tipo III ed alcuni geni codificanti per CWDEs. Attraverso il T3SS così formato possono essere secrete una serie di proteine che stimolano la proliferazione batterica. Con l'aumentare della densità batterica aumenta anche la concentrazione del 3-idrossi acido palmitico metil estere (3-OH PAME), un autoinduttore molecolare che attiva il regolatore dell'espressione PchA, fino a questo momento inattivo. PchA regola negativamente il gene *HrpB*, ed attiva geni codificanti per EPS e potenti CDWEs quali cellulasi e pectin metil esterasi (figura 3.2).

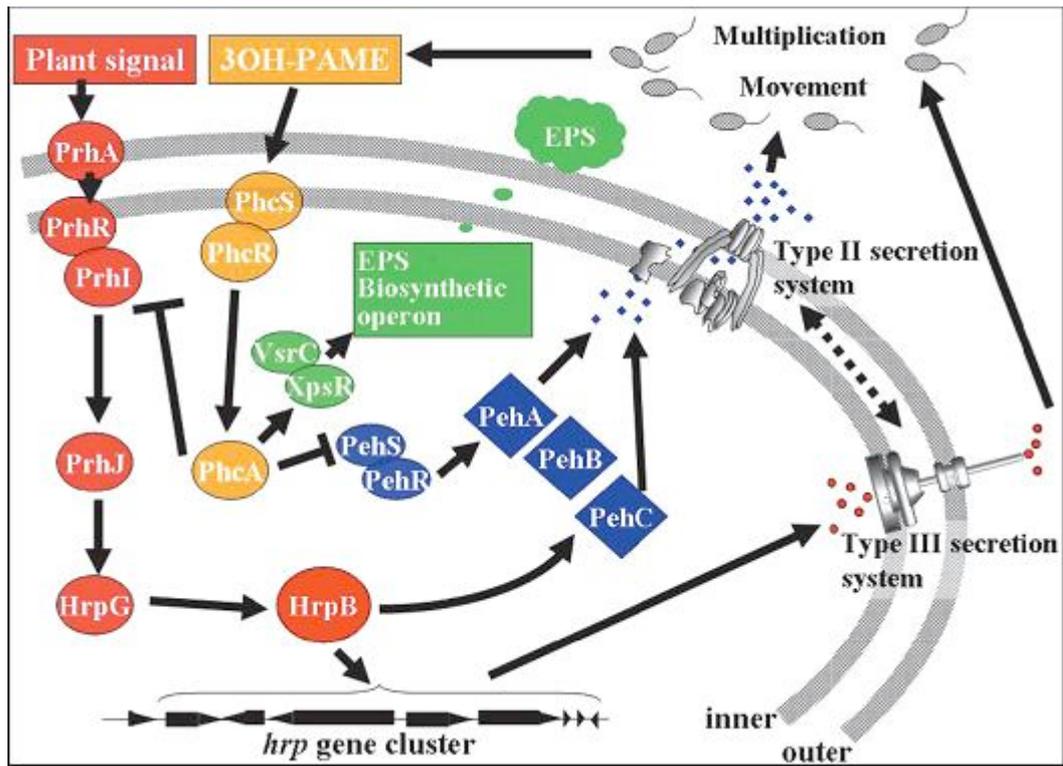


Figura 3.2. Rappresentazione della regolazione di geni codificanti per fattori di patogenicità in *Ralstonia solanacearum* (Hikichi *et al.*, 2007).

Il primo sintomo visibile è un avvizzimento delle foglie, che può interessare anche solo una parte della pianta (appassimento asimmetrico), durante le ore più calde, seguito da ripresa della vegetazione durante la notte; col progredire della malattia l'avvizzimento diventa irreversibile e porta nel giro di poco tempo la pianta al collasso.

Nelle prime fasi di sviluppo della malattia si può osservare una striatura di colore marrone sul fusto a circa 2,5 cm sopra la linea del suolo, mentre le foglie assumono una tonalità bronzea, con epinastia del picciolo. Se si incide la pianta si può osservare la fuoriuscita dai fasci vascolari di aggregati batterici viscosi di colore bianco. Immergendo in un contenitore con acqua un fusto di patata infetto, si nota la spontanea fuoriuscita di queste masse batteriche mucillaginose sotto forma di tipici filamenti, tale fenomeno non viene prodotto da altre specie batteriche, per cui il test assume valore diagnostico presuntivo in campo.

In funzione dello stadio di sviluppo della malattia possono essere visibili sintomi esterni sui tuberi, anche se tali manifestazioni possono essere confuse con quelle del marciume ad anello dovuto a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

(EPPO/CABI, 1996). L'infezione di *R. solanacearum* può essere distinta grazie al tipico essudato batterico che spesso fuoriesce dalle gemme e dall'attaccatura del fusto dei tuberi infetti, che quando l'essudato si secca, viene ricoperto da una massa di terra. Tagliando i tuberi infetti si rivela imbrunimento e necrosi dell'anello vascolare e dei tessuti immediatamente adiacenti, qualche minuto dopo il taglio in genere fuoriesce dall'anello di fasci vascolari un fluido cremoso, mentre nel caso del marciume ad anello dovuto a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, il tubero deve essere premuto per osservare la fuoriuscita di una massa giallognola di tessuto vascolare disfatto misto a mucillagine batterica. Infezioni a partire dalle lenticelle sui tuberi, provocano sintomi atipici quali macchie necrotiche dell'epidermide (Rodrigues-Neto *et al.*, 1984).

Piante con sintomi fogliari causati da *R. solanacearum* possono produrre sia tuberi sani che infetti, mentre piante che non mostrano nessun segno della malattia possono a volte produrre tuberi infetti.

L'isolamento del batterio da materiale con evidenti sintomi dell'infezione è facilmente effettuato usando un substrato non selettivo come l'YPD agar (yeast peptone dextrose), mentre sono disponibili diversi substrati colturali selettivi per l'isolamento del patogeno da materiale infetto in maniera latente o da substrati difficili come acque superficiali, suoli o rifiuti. Per l'identificazione del patogeno si possono effettuare test biochimici, analisi degli acidi grassi, analisi RFLP e proteiche (Seal *et al.*, 1993 e 1994).

La diagnosi di infezioni latenti può essere effettuata mediante immunofluorescenza indiretta (IFAS), piastraggio su substrato selettivo come l'SMSA combinato con un saggio PCR, test ELISA o ibridazione con fluorescenza *in-situ*, prelevando un campione di almeno 200 tuberi per ogni 25 tonnellate di prodotto; come ulteriore conferma, si possono eseguire test di patogenicità sul pomodoro per confermare i campioni positivi (OEPP/EPPO Bulletin, 2004).

3.1.3 *Importanza economica della malattia*

Il batterio fitopatogeno *R. solanacearum* costituisce un serio ostacolo alle coltivazioni di molte Solanacee sia nelle regioni tropicali che in quelle temperate. I maggiori danni economici sono descritti su patata, tabacco e pomodoro nel Sud-Est degli USA, Indonesia, Brasile, Colombia e Sud Africa. Nelle Filippine, nel periodo 1966-1968, si sono avute perdite di raccolto di circa il 15% per il pomodoro, 10% per melanzana e peperone, e 2-5% per il tabacco (Zehr, 1969). Nella regione amazzonica del Perù, circa metà delle piantagioni di banana sono infette e la rapida diffusione del patogeno, minaccia di distruggere le piantagioni della giungla peruviana (French *et al.*, 1968). In India, in alcuni casi, si è arrivati a perdite di produzione totali per il pomodoro; in Israele, le perdite si verificarono soprattutto in patata, e sono state più ingenti per le coltivazioni primaverili rispetto alle invernali, per via delle più alte temperature (Volcani *et al.*, 1960). Grosse perdite su patata sono state descritte anche in Grecia nel periodo 1951-1953 (Zachos, 1957).

La gravità della malattia è maggiore se *R. solanacearum* si trova in associazione con nematodi radicali. In tabacco, l'infestazione da nematodi modifica la fisiologia delle piante, causando suscettibilità all'avvizzimento batterico (Chen, 1984). Esperimenti in India mostrarono che i danni prodotti dall'associazione tra *R. solanacearum* e il nematode galligeno *Meloidogyne javanica*, sono maggiori dei danni prodotti singolarmente dai patogeni (Sitaramaiah *et al.*, 1984).

3.1.4 *Il controllo della malattia*

La possibilità che *R. solanacearum* selezioni razze adattate a differenti condizioni ambientali, rappresenta un reale pericolo per le coltivazioni europee e mediterranee di patata e pomodoro. Da questo punto di vista le zone più calde di queste aree sono quelle più esposte al rischio. La razza 3 (biovar 2) è quella che ha la maggior possibilità di adattarsi ai climi temperati, dove può arrivare attraverso importazioni di patate e tuberi-seme infetti in maniera latente, provenienti da aree dove è presente la malattia. L'introduzione di patate da foraggio secco o ad uso industriale infette può essere una fonte di inoculo qualora tale materiale può essere impiegato in agricoltura.

Il controllo dell'avvizzimento batterico è molto difficile, specialmente quello causato dalla razza 1, a causa del suo ampio *range* di piante ospiti. Il controllo chimico del patogeno è poco efficace. Disinfestazioni del suolo mostrano effetti molto limitati (Murakoshi *et al.*, 1984); antibiotici quali streptomina, ampicillina, tetraciclina e penicilline difficilmente hanno effetto (Frag *et al.*, 1982) o addirittura aumentano l'incidenza della malattia, come nel caso della streptomina in prove effettuate in Egitto, (Frag *et al.*, 1986).

Il controllo biologico è ancora in fase sperimentale, ma qualche risultato positivo si è avuto con l'impiego di antagonisti quali *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens* in prove di laboratorio nelle Filippine (Aspiras *et al.*, 1985). In Cile *Pseudomonas fluorescens* ha dato risultati positivi nel controllo di *Ralstonia solanacearum* su coltivazioni di patata e prove di laboratorio. Alcuni studi hanno impiegato anche mutanti avirulenti del batterio (Ciampi-Panno *et al.*, 1989; Gallardo *et al.*, 1989; Hartman *et al.*, 1994).

Il miglioramento genetico ha fornito diverse cultivar di patata ed altre colture resistenti al patogeno, ma la molteplicità di razze e ceppi del patogeno rendono difficile il loro utilizzo nei differenti paesi. Cultivar di patata sviluppate in Colombia, utilizzando come materiale resistente *Solanum phureja* e *Solanum demissum*, hanno mostrato resistenza a *Ralstonia solanacearum* in 7 diversi paesi (French, 1985; Hartman *et al.*, 1994).

L'avvicendamento colturale della patata con mais o fagiolo, in certi casi, riduce la densità d'inoculo e lo sviluppo della malattia (Autrique *et al.*, 1987), ma il ritrovamento di microlesioni sulle piante evidenzia che *R. solanacearum* può conservarsi in maniera silente su tali colture (Granada *et al.*, 1983).

Il frazionamento dei tuberi seme può incrementare l'incidenza della malattia di 2,5 volte e la perdita in campo di circa il 40% (Vijayakumar *et al.*, 1985). Rotazioni lunghe (5-7 anni) con specie non suscettibili sono raccomandabili in casi di aree infestate dal patogeno. La variazione del pH del suolo mediante l'uso di appropriati concimi, può eradicare il patogeno dal suolo. La malattia è più dannosa in suoli sabbiosi, argillosi e torbosi, mentre non è stata mai riscontrata in terreni di marna. In Australia la razza 3 è sopravvissuta per 2-3 anni in terreni incolti grazie a residui vegetali di piante ospiti e tuberi infetti presenti negli strati più profondi di suolo (Graham *et al.*, 1979a; Graham *et al.*, 1979b).

Per evitare la diffusione della razza 3 nelle regioni a clima temperato è necessario:

- a. uso di tuberi seme di patate sani e certificati esenti dal patogeno;
- b. rapida e puntuale identificazione e denuncia della presenza del patogeno;
- c. applicazione delle misure di quarantena sui campi e sulle aziende contaminate;
- d. sufficiente rotazione delle coltivazioni;
- e. controllo delle erbe infestanti ospiti del patogeno;
- f. controllo delle infestazioni di nematodi;
- g. mancato utilizzo di acqua di superficie per l'irrigazione;
- h. sensibilizzazione degli agricoltori nei confronti del problema.

3.1.5 *La specie selvatica Solanum commersonii*

Le specie selvatiche di patata rappresentano un'utile fonte di geni non presenti nelle varietà coltivate, nonché di diversità allelica necessaria per ottenere l'eterosi al fine di migliorare la produzione di tuberi ed altri caratteri quantitativi (Hanneman 1989).

Diverse specie selvatiche, quali *Solanum circaeifolium*, *Solanum vernei*, *Solanum sparsipilum*, *Solanum chacoense*, e *Solanum hougasii*, sono state utilizzate nel miglioramento genetico della patata come fonte di resistenza a diversi agenti patogeni ed insetti (Louwes *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999). La maggior parte delle specie selvatiche del genere *Solanum*, però, è poco utilizzata a causa dell'enorme lavoro di *breeding* necessario per eliminare i caratteri indesiderati che si trasmettono, insieme a quelli utili, dalla specie selvatica (Pavek *et al.*, 2001).

La specie diploide *S. commersonii* Dun. è una specie selvatica che tuberizza, appartenente alla sezione Petota Dumontier, sottosezione Potato G.Don del genere *Solanum*; essa è diffusa come specie selvatica in Uruguay, dove cresce spontaneamente in campi incolti.

S. commersonii è una delle maggiori risorse per il miglioramento genetico della patata, sia per la resistenza alle basse temperature e ad alcuni comuni patogeni della patata (Hawkes, 1992), che per l'elevata variabilità genetica (Pianzola *et al.*, 2005). Vazquez e collaboratori (1997), da una dettagliata analisi fitochimica condotta su piante di *S. commersonii* proveniente dall'Uruguay, hanno

evidenziato la presenza dei glicoalcaloidi demissina ($\Delta 5$ -demissina), commersonina ($\Delta 5$ -commersonina) e tomatina. Questi metaboliti secondari sono attivi nei confronti di insetti quali *Leptinotarsa decemlineata* ed *Empoasca fabae* (Tingey *et al.*, 1978; Tingey, 1984). *S. commersonii*, inoltre, è stata descritta come resistente a *R. solanacearum*, agente causale dell'avvizzimento batterico della patata (La Ferriere *et al.*, 1999).

L'utilizzo di *S. commersonii* per il miglioramento genetico della patata è però reso difficile dalla presenza di numerosi caratteri indesiderati come l'alto contenuto in glicoalcaloidi dei tuberi; la presenza di lunghi stoloni; la mancanza di tuberizzazione in condizioni di giorno lungo e l'isolamento sessuale da cloni apolidi di *Solanum tuberosum*, a causa di barriere di incompatibilità post-zigotica (Johnston *et al.*, 1980; Johnston *et al.*, 1982). Nel 1997 Carputo e collaboratori hanno sviluppato uno schema di incrocio basato sulle ploidie ponte per superare queste barriere.

3.1.6 Scopo del lavoro

Obiettivo di questa parte del lavoro è lo studio dell'interazione tra il batterio *R. solanacearum* e piante di patata, dato che questo è un batterio fitopatogeno tra i più pericolosi dell'area tropicale e subtropicale.

In particolare si vuole comprendere il meccanismo di interazione di questo patogeno con un genotipo resistente (*S. commersonii*) ed uno suscettibile (*S. tuberosum* cv. Blondy). Per raggiungere tale obiettivo ed identificare geni-chiave dell'interazione *Ralstonia*-patata, è stato effettuato uno studio trascrittomico con un chip microarray costruito con tecnologia CombiMatrix utile per identificare geni differenzialmente espressi, e per ipotizzare la loro funzione nella risposta di resistenza e/o suscettibilità. Il coinvolgimento di alcuni geni identificati mediante analisi trascrittomica comparativa, e di altri derivanti da studi di letteratura, nella risposta della patata ad attacchi di *R. solanacearum* è stato poi verificato mediante analisi Real Time qPCR.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale costituito da due specie di *Solanum*, la specie coltivata *S. tuberosum* cv. *Blondy* e la specie selvatica *S. commersonii*, è stato fornito dal Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, sezione di Genetica Vegetale.

Dal momento che gli studi molecolari da svolgere imponevano l'utilizzo di materiale vegetale uniforme dal punto di vista genetico, le due specie utilizzate per l'inoculo con il patogeno sono state ottenute per micropropagazione vegetativa *in vitro*, a partire da un'unica pianta rispettivamente di *S. tuberosum* cv *Blondy* e *S. commersonii*, allevate poi *in vivo* nelle camere di crescita del Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, sezione di Genetica Vegetale.

La propagazione delle piantine è stata condotta in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare. Le piantine sono state ottenute a partire da microtalee, formate da una porzione di fusto recante una gemma ascellare, collocate per la radicazione in appositi vasetti di plastica sterili richiudibili, contenenti substrato agarizzato a base di sali di Murashige & Skoog con vitamine (1962). Prima dell'uso, il substrato, il cui pH è stato portato a 5,8 con una soluzione di KOH 1M, è stato sterilizzato mediante autoclave (20 minuti a 121°C).

La radicazione delle microtalee e la crescita delle piantine è avvenuta in apposite camere di crescita, con condizioni controllate di illuminazione (18 ore di luce e 6 ore di buio) e temperatura (24°C). Le piantine, una volta raggiunti i 5 cm di altezza, sono state trapiantate in vasetti di 6 cm di diametro contenenti terriccio sterilizzato e, successivamente, sottoposte ad un periodo di acclimatamento in un'apposita cella condizionata, durante il quale è stata prestata particolare attenzione al tasso di umidità che gradualmente passava dal 100% all'85%.

3.2.2 *Test di patogenicità in vivo e campionamento del materiale verde*

Il test di patogenicità è stato effettuato utilizzando il ceppo SA93, razza 3, biovar 2 del batterio fitopatogeno *R. Solanacearum* presso il Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale dell'Università di Napoli Federico II. Quando le piantine hanno raggiunto i 10 cm di altezza sono state inoculate, a livello delle radici, precedentemente ferite con un bisturi, con 2 ml di una sospensione del batterio fitopatogeno contenente 5×10^7 cfu. Inoltre alcune piante di entrambe le specie in studio sono state inoculate allo stesso modo con 2 ml di acqua distillata per fungere da controllo dell'esperimento. Nelle successive 72-96 ore è stato monitorato il manifestarsi dei classici sintomi della malattia sulle piante di *Solanum tuberosum* cv. Blondy così inoculate. Sia per le piante controllo che per le piante inoculate è stato campionato materiale a, 72 ore e 6 giorni dall'inoculazione, in particolare sono stati raccolti foglie/fusti, e radici.

Il materiale raccolto è stato immediatamente immerso in azoto liquido (-196°C) e di seguito, fino al momento dell'utilizzo per i successivi esperimenti, riposto in un congelatore alla temperatura di -80°C . Come ulteriore verifica dell'esito del test, sulle piantine inoculate e sui testimoni che non sono stati precedentemente campionati, sono stati rilevati i sintomi della malattia dopo 6, 9 e 12 giorni dall'inoculazione.

3.2.3 *Esperimento MicroArray con tecnologia CombiMatrix*

3.2.3.1 *Estrazione RNA totale*

L'estrazione dell' RNA totale è stata effettuata da radici e da foglie più fusti di piante di *S. commersonii* e di *S. tuberosum* cv Blondy sane ed infette con *R. solanacearum* a 72 ore e 6 giorni dopo l'infezione utilizzando il protocollo dell'RNAwiz (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) con alcune modifiche. Per ogni estrazione sono stati utilizzati 100 mg di tessuto precedentemente congelato in azoto liquido e polverizzato in mortaio con l'impiego di un pestello. Il campione polverizzato è stato inserito in un tubo Eppendorf e risospeso in 1 ml di RNAwizTM (Ambion).

Dopo aver aggiunto 200 μl di cloroformio il campione è stato miscelato vigorosamente per 20 secondi, incubato a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugato a 14000 x g per 15 minuti a 4°C . Alla fase acquosa sono stati

aggiunti 500 µl di acqua sterile ed è stato miscelato il tutto. Alla soluzione è stato poi aggiunto 1 ml di isopropanolo ed è stato incubato a temperatura ambiente per 20 minuti. La miscela è stata centrifugata per 25 minuti a 14000 x g a 4°C, è stato allontanato il surnatante e lavato il pellet con 1 ml di etanolo al 75%. La soluzione è stata centrifugata a 14000 x g a 4°C per 5 minuti ed è stato allontanato il surnatante. Il pellet è stato fatto asciugare all'aria per circa 15 minuti e l'RNA successivamente disciolto in un appropriato quantitativo di acqua. L'RNA è stato quantizzato al NANODROP 2000c e la sua integrità è stata determinata mediante elettroforesi su gel d'agarosio e confermata utilizzando un AGILENT 2100 Nano Bioanalyzer con un nano chip RNA 6000. Dall'RNA sono poi state allontanate eventuali contaminazioni di DNA utilizzando il DNA Free kit (Ambion) seguendo le raccomandazioni del fornitore. Le concentrazioni di RNA sono state infine determinate utilizzando uno spettrofotometro Bio Rad Smart Spec 3000 (Spectrophotometer, Bio-Rad) e conservato a -80°C.

3.2.3.2 Sintesi dell'RNA antisense

L'aRNA è stato sintetizzato utilizzando l' *RNA ampULSe Amplification and Labeling Kit for CombiMatrix array* della Kreatech Biotechnology e marcato con il colorante fluorescente Cy5 ULS. Il primo passo prevede la sintesi del primo filamento del cDNA.

In un tubo da 0.5-ml sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 1000 ng di RNA totale in volume massimo di 10 µl
- T7-Oligo(dT) Primer 1 µl
- Acqua nuclease- free fino ad un volume di 12 µl

La miscela di reazione è stata incubata a 70°C per 10 min, raffreddata in ghiaccio per 1 min, e centrifugata brevemente. Successivamente sono stati aggiunti:

- 10X First-Strand buffer 2 µl
- dNTP Mix (10mM) 4 µl
- Inibitore RNase (40U/µl) 1 µl
- Array script (200 U/µl) 1 µl

Fino ad ottenere un volume finale di reazione di 20 μ l.

Il tubo è stato brevemente centrifugato e incubato a 42°C per 2 ore

Successivamente si è proceduti alla sintesi del secondo filamento del cDNA. Al tubo di reazione sono stati aggiunti:

- Acqua nuclease-free 63 μ l
- 10X Second-Strand buffer 10 μ l
- dNTP Mix (10mM) 4 μ l
- DNA Polymerase I (10U/ μ l) 2 μ l
- RNase H (10U/ μ l) 1 μ l

La miscela di reazione è stata incubata a 16°C per 2 ore, e poi raffreddata in ghiaccio. Per la purificazione del cDNA a doppio filamento così ottenuto sono stati aggiunti 250 μ l cDNA Binding Buffer in ogni campione e la miscela è stata caricata in una Spin Column, fornita dal kit. I campioni sono stati centrifugati per un 1 minuto a 10,000 x g e poi è stato eliminato il surnatante. Il cDNA è stato lavato con 500 μ l di Wash Buffer e centrifugato per due volte 1 minuto a 10,000 x g. Infine, per eluire il cDNA trattenuto nella colonnina sono stati aggiunti 20 μ l di acqua nucleasi-free e il tutto è stato incubato per 2 minuti a temperatura ambiente. Una volta ottenuto il cDNA si è proceduto alla reazione di trascrizione *in vitro* per ottenere la sintesi dell'arRNA aggiungendo a temperatura ambiente i seguenti reagenti:

- ds-cDNA 16 μ l
- T7 rNTP mix (75mM) 16 μ l
- T7 10X Reaction Buffer 4 μ l
- T7 Enzyme Mix 4 μ l

La reazione è stata incubata a 37°C over-night, alla fine della incubazione, per interrompere la reazione di sintesi, sono stati aggiunti 100 μ l di acqua nuclease-free ottenendo un volume finale di 140 μ l.

Si è passati quindi alla fase di purificazione dell'aRNA aggiungendo 350 µl di Binding Buffer e 250 µl di etanolo al 100%; il tutto è stato centrifugato per 1 minuto a 10,000 x g, è stato scartato il surnatante ed è stato lavato con etanolo e Wash buffer e centrifugato per due volte 1 minuto a 10,000 x g. Infine, per eluire l' aRNA sono stati aggiunti 100 µl di acqua nucleasi-free con successiva incubazione per 2 minuti a temperatura ambiente e centrifugazione per 2 minuti a 10,000 x g.

La qualità e la quantità dell'aRNA ottenuto è stata controllata al NANODROP 2000c prima di passare alla fase di marcatura della molecola con Cy5 ULS.

Per la marcatura a 1-1.5 µg di aRNA sono stati aggiunti:

- 1 µl di Cy5 per 1 µg di aRNA
- 1/10 del volume di 10X Labeling Solution
- Acqua nuclease-free fino a 20 µl

La reazione è stata incubata per 15 minuti a 85°C, l'eccesso di fluoroforo è stato rimosso mediante l'uso di colonnine fornite dal kit.

3.2.3.3 *Disegno del chip*

Per l'analisi microarray sono stati utilizzati due chip sintetizzati entrambi su di una piattaforma CombiMatrix presso il Dipartimento Scientifico e Tecnologico dell'Università degli Studi di Verona in collaborazione con il Prof. Massimo Delledonne.

Il primo chip è un chip 4 x 2K costituito da una matrice di 12.000 microelettrodi sui quali è avvenuta la sintesi chimica *in situ* di sonde oligonucleotidiche (probes) di 35-mer. Le *probe* selezionate sono 658 ed ognuna è stata ripetuta 4 volte e distribuita casualmente nel chip in maniera da poter misurare la variabilità dell'ibridazione all'interno del chip stesso. Come controllo negativo interno sono state scelte nove sequenze di batterio (*spike probe*). Le probes sono state disegnate a partire da EST di pomodoro presenti nel TomatEST database (<http://biosrv.cab.unina.it/tomatestdb/index.php>), ottenute da un esperimento di PCR select condotto sulla cv Hawaii 7996 di *S. lycopersicum* inoculata con *R. solanacearum*.

Il secondo chip è un chip 90K su cui sono state sintetizzate 24928 sonde di DNA con quattro repliche per ogni sonda; ogni sonda consiste in oligonucleotidi di 35-mer disegnati per essere specifici per ciascuna EST derivante dal PotatEST ISOL@ database (<http://biosrv.cab.unina.it/solestdb/>). Come controllo negativo sono state utilizzate nove sequenze oligonucleotidiche fornite da CombiMatrix.

3.2.3.4 Ibridazione e analisi dell'immagine

L'aRNA marcato è stato ibridato sui chip. I chip sono stati pre-ibridati in un fornetto per ibridazione per 30 minuti a 45°C con una soluzione di pre-ibridazione (tabelle 3.1). Prima di passare alla fase di ibridazione vera e propria l'aRNA marcato è stato frammentato in modo da aumentare la specificità della ibridazione, in particolare a 1-4 µg di aRNA sono stati aggiunti 20 µl della reazione di frammentazione dell'RNA (tabelle 3.2 A, 3.2 B) il tutto è stato incubato a 95°C x 2 minuti. Successivamente, una volta eliminata la soluzione di pre-ibridazione, è stata riempita la cameretta del chip con la soluzione di ibridazione (tabella 3.3) e successivamente incubata a 45°C per 16 ore. In particolare sul chip 4X2K sono stati ibridati i campioni nelle seguenti condizioni :

- *S. commersonii* radici da piante inoculate e non dopo 72 ore;
- *S. commersonii* foglie/fusti da piante inoculate e non dopo 72 ore;
- *S. tuberosum* cv. Blondy radici da piante inoculate e non dopo 72 ore;
- *S. tuberosum* cv. Bondy foglie/fusti da piante inoculate e non dopo 72 ore;
- *S. commersonii* radici da piante inoculate e non dopo 6 giorni;
- *S. commersonii* foglie/fusti da piante inoculate e non dopo 6 giorni;
- *S. tuberosum* cv. Blondy foglie/fusti da piante inoculate e non dopo 6 giorni.

Sul chip 90K sono stati ibridati i seguenti campioni :

- *S. commersonii* radici da piante inoculate e non dopo 6 giorni;
- *S. commersonii* foglie/fusti da piante inoculate e non dopo 6 giorni.

Al termine delle ibridazioni il chip è stato lavato alternando differenti Wash buffer (tabelle 3.4, 3.5, 3.6) fino all'ultimo lavaggio effettuato con PBST Wash Solution (tabella 3.7) con il quale è stato incubato per 1 minuto a temperatura ambiente. I chip sono stati scannerizzati con uno scanner Perkin Elmer ScanArray 4000 XL e l'acquisizione dell'immagine è stata ottenuta con il software ScanArray Express Microarray Analysis System Version 4.0; tutti i dettagli dell'esperimento sono disponibili nel sito http://www.combimatrix.com/support_docs.htm. CustomArray® 12K Microarray - Hybridization and Imaging Protocol (PTL006).

3.2.3.5 Estrazione, normalizzazione e filtrazione dei dati

Dopo la scansione del chip microarray le immagini TIF sono state processate per ottenere dati numerici con il software CombiMatrix Microarray Imager versione 5.8.0 copy@right 2001. Il manuale d'uso del programma è disponibile nel sito internet: <https://webapps.combimatrix.com>. La mediana ed i valori di deviazione standard di ogni singola probe sono successivamente esportati nel software SPSS. La normalizzazione tra gli array è stata ottenuta correggendo la mediana di ogni sonda con il rapporto tra le mediane degli array e la media delle mediane degli array stessi. Successivamente alla normalizzazione dei dati e al controllo della qualità tutti i valori sono stati trasformati in log (log in base due). In conclusione, i segnali delle sonde aventi un coefficiente di variabilità più alto di 0.5, così come le sonde *spikes* e *factory*, sono state eliminate. Quindi, le sonde che mostravano un aumento o una diminuzione del 10% dell'intensità del segnale sono state eliminate.

3.2.3.6 Analisi statistiche e bioinformatiche

I geni differenzialmente espressi ottenuti dal chip di pomodoro sono stati identificati mediante un'analisi SAM (Significance Analysis of Microarrays) contenuta all'interno del software TMEV (TIGR Multiple Experiment Viewer) versione 4.4.0 (<http://www.tigr.org/software/tm4>- Saeed *et al.*, 2003).

I segnali differenzialmente espressi ottenuti dal chip di patata, invece, sono stati identificati usando il modulo t-test contenuto all'interno del software TMEV (TIGR Multiple Experiment Viewer) versione 4.4.0 (<http://www.tigr.org/software/tm4>- Saeed *et al.*, 2003). Per analizzare le coregolazioni esistenti tra i segnali differenzialmente espressi è stata effettuata una Relevance Network Analysis utilizzando la correlazione di Pearson con un threshold pari a 0,92. Le sequenze degli EST che hanno mostrato espressione differenziale sono state utilizzate come input per il software Blast2GO (<http://blast2go.bioinfo.cipf.es/>- Conesa *et al.*, 2005). Le sequenze EST sono state quindi annotate, categorizzate e mappate per ontologie.

Le sequenze EST dei geni differenzialmente espressi sono stati analizzati anche mediante il Plant Resistance Genes database (<http://prgdb.cbm.fvg.it/>; Sanseverino *et al.*; 2009) per individuare la presenza di domini conservati caratteristici dei geni di resistenza. Tali sequenze sono state successivamente analizzate per verificare la posizione cromosomica sul genoma di pomodoro e sui superscaffold di patata utilizzando il Sol Genomics database (<http://solgenomics.net>).

3.2.4 *Analisi RT-qPCR*

Per validare l'esperimento microarray sono state effettuate Real-Time quantitative con la macchina 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). L'amplificazione è stata condotta in un volume di reazione di 12,5 µl utilizzando una Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). La quantificazione relativa è stata ottenuta con il metodo del $\Delta\Delta C_t$. Le coppie di primer sono state disegnate utilizzando il software Primer Express (tabella 3.8). Come regione di matching è stata considerata l'ORF più lunga e come lunghezza ideale dell'amplicone 50-150 bp. Le coppie di primer sono state validate usando la curva standard ottenuta in un range di diluizione da 1 a 10^{-3} ($R^2 > 0.98$ e pendenza di -3.3). Come gene endogeno è stato utilizzato l'Elongation Factor alfa 1 (EFalfa 1).

Tabella 3.1. Soluzione di pre-ibridazione.

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 100 μ l
2X Soluzione Ibridazione stock	50 μ l
Acqua Nuclease-free	34 μ l
50X Soluzione di Denhart	10 μ l
DNA Sperma di salmone (10 mg/ ml)	1 μ l
1% SDS	5 μ l

Tabella 3.2 A. Reazione di frammentazione dell'RNA

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 20 μ l
Acqua Nuclease-free	fino a 16 μ l
5X soluzione frammentazione RNA	4 μ l
RNA marcato	1-4 μ g

Tabella 3.2 B. Reazione di frammentazione dell'RNA

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 10 ml
1M Tris-Acetato	2 ml
KOAc	0,49 gr
MgOAc	0,32 gr
Acqua	fino a 10 ml

Tabella 3.3. Soluzione Ibridazione

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 100 μ l
2X Soluzione Ibridazione stock	50 μ l
DI Formammide	25 μ l
RNA marcato	5 μ l
DNA Sperma di salmone (10 mg/ml)	1 μ l
1% SDS	4 μ l
Acqua Nuclease-free	fino a 100 μ l

Tabella 3.4. 6X SSPET Wash Solution

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 10 ml
20X SSPE	3 ml
10% Tween-20	50 μ l
Acqua Nuclease-free	6,95 ml

Tabella 3.5. SSPET Wash Solution (3X)

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 10 ml
20X SSPE	1,5 ml
10% Tween-20	50 μ l
Acqua Nuclease-free	8,45 ml

Tabella 3.6. SSPET Wash Solution (0,5X)

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 10 ml
20X SSPE	250 μ l
10% Tween-20	50 μ l
Acqua Nuclease-free	9,7 ml

Tabella 3.7. PSBT Wash Solution

SOSTANZA/REAGENTE	VOLUME per 10 ml
10X PSB	2 ml
10% Tween-20	100 μ l
Acqua Nuclease-free	7,9ml

Tabella 3.8. Sequenze dei primer utilizzati per effettuare l'RT-qPCR

nome primer	primer forward	primer reverse
DV104820	TACCATAACCAGAGGCACCAT	AATAAAACAAAAGAAGTAGGTCTCA
DV104327	AACCACCGCTGCAAGAAC	TTGTATGGATTGGTAAGAGGACTG
DV104592	ATTCATTTTCAGCAGCGTATTTT	ACATGAGGCCTAATCCGAAA
DV104602	GCTGCTGAGATAGTTTCTGCTGT	ATTCATTTTCAGCAGCGTATTTT
DV104599	ACAAAAGGGGACTTTTGAGCA	ACCCCACAACTTCTTTTGGAT
DV105077	GGTTTGAGGTCTCGATGCAC	GCTGCTGAGATAGTTTCTGCTGT
DV104375	CCAACGGAATCAACTGAAACT	ATCCCAITGCCTCGTCTTC
BW686020	TCATTTTCATAAAACGAAAAACGTG	GCATCTGCATAATACTACAGTCCAC
DV104332	TGAAGATTCCAATTTATAGCTTTGC	GGAGTGTAACAAAAGAAGTAGTCCA
DV104343	TACCATAACCAGAGGCACCAT	GTGGTGGTGGTGGCAATTAT
DV104861	AACTTAAAGGAATTGACGGAAGG	TCCCCGTGTTGAGTCAAATTA
DV104966	TGCTGGGGAGAATCTTGC	CCTCTCGGACCCACAAT
DB682882	GCACGGGGAGTGAAACAC	TTGCCCTTGAGGTCTTGC
DV104447	ATTCACTGGCCGTCGTTTTA	GGCGATTAAGTTGGGTAACG
DV104600	GCCAATACGCTATTTA	GTCAATTGAGTCAATAAT
id_11159	GCTGATTCTGGGTTTCAAGCTAA	TGACCGTGCTGAAGTAGGT
id_11401	CATGAGGTGCTACTCAGAGCATT	TCCAACAACATAGCTCCATC
id_12897	TGATCGAATCGAGCTAGAGGA	TTGGGTCTGTGTCCTGGAA
id_18196	TCTCACATTCGAGAGATACTTCCA	TCTTCATCCAGTCCAACGATT
id_19255	CCCTCTTATTTATTTACATTCATCTT	CAATTCATTTCAACATGATACACCT
id_20223	GAGCCAAGTTGTTTCGATGCT	GCCTTCGATCCTCTCTTGGT
id_23180	AAAAATAAAAATCAATCGCATCAAT	TTCGCTAGTTCAATCCTATCAGTAAC
id_23734	TGGGCAGTGAGGAGATCAA	ATAACAATCGCATCAATAAAAA
id_4363	TGCTCTTCAGCTTGAGGAAAAC	GGTTCGTGCTGTTATCATCG
id_8141	TTGATAAGCTTCCCGTCATT	TCAGCTTGGCTGATGCAA
id_8978	TGGCAAGGCATCGAATTCCATT	GCAATGCCGGGAGTCAATG
GluA	TCAGCAGGGTTGCAAAAATCA	CTCTAGGTGGGTAGGTGTTGGTTAA
Osmotina	GGGAAAATGTCATCCAATTCA	AAGTGAACCAGGGCAITCAC
Pr-1a	GAGGGCAGCCGTGCAA	CACATTTTCCACCAACACATTG
Pr-1b	TTGGTGACTGCGGGATGA	GGCGGGGCTAGGTTT
Remorina	GGGAGAACAGCAAGAAAGCA	TCAACAATTGCTCCTCAGTCC

3.3 Risultati

3.3.1 Test di resistenza al patogeno *Ralstonia solanacearum*

Per poter individuare i geni differenzialmente espressi durante l'interazione compatibile ed incompatibile tra piante di patata ed il patogeno *R. solanacearum*, sono state inoculate sia piantine della specie suscettibile *S. tuberosum* cv Blondy che di quella resistente *S. commersonii*, come riportato nel paragrafo 3.2.2. Al fine di verificare l'effettiva virulenza di *R. solanacearum* nei confronti di *S. tuberosum*, un'aliquota della sospensione batterica impiegata successivamente nei saggi di patogenicità, è stata anche inoculata direttamente, tramite siringa, alla base dei fusticini di diverse piante di *S. tuberosum*. In tutti i casi è stato possibile osservare l'inizio della comparsa dei classici sintomi della malattia (avvizzimento batterico) (figura 3.3) nelle 48-72 ore successive all'inoculazione.



Figura 3.3. Immagine esemplificativa dei sintomi di avvizzimento batterico mostrati da *Solanum tuberosum* cv Blondy 48 ore dopo l'inoculazione di *Ralstonia solanacearum* nel fusto di piantine.

Per verificare l'avvenuta infezione del batterio nelle piante di *S. tuberosum* cv Blondy e *S. commersonii*, è stato effettuato un reisolamento da fusti e radici, mediante macinatura in mortaio di frammenti di fusti e radici e piastramento di

aliquote del macinato su substrato selettivo per *R. solanacearum*. Nel 98% dei casi i fusti delle piante di *S. commersonii* a differenza di quelli di *S. tuberosum* cv Blondy non presentavano il batterio.

All'avvizzimento batterico (72-96 ore dopo l'inoculazione) seguiva la morte della pianta nei 10 giorni successivi all'inoculazione nel caso di *S. tuberosum* cv Blondy, mentre *S. commersonii* ed i controlli inoculati con acqua erano del tutto asintomatici (figura 3.4).

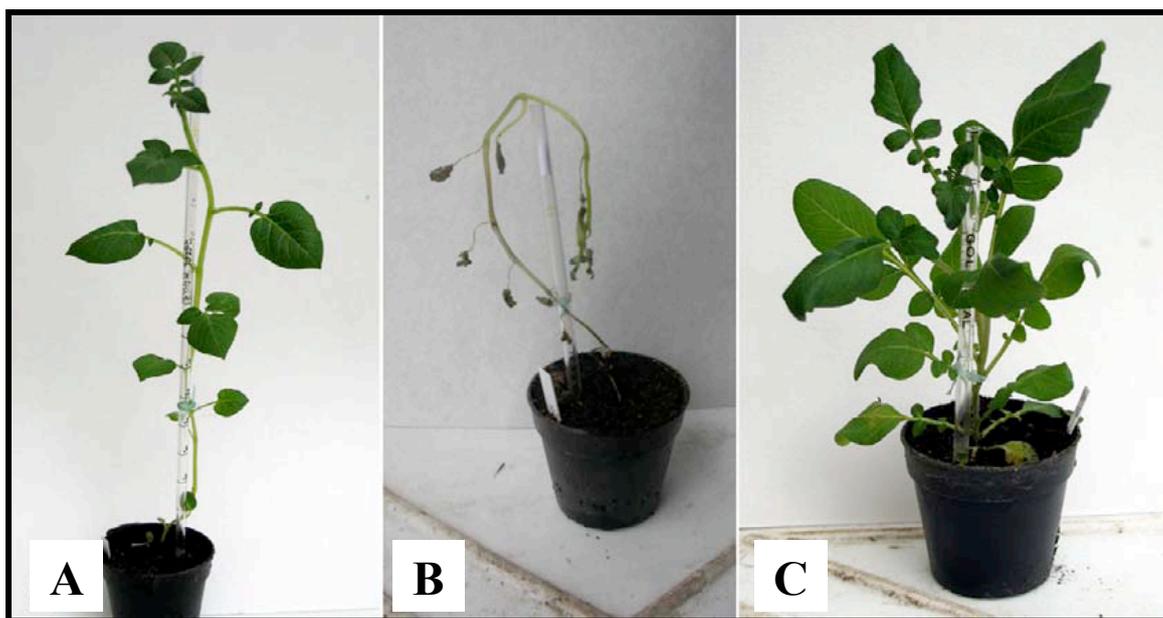


Figura 3.4 *Solanum tuberosum* cv Blondy e *Solanum commersonii* 10 giorni dopo l'inoculazione con *R. solanacearum*: **A:** *Solanum tuberosum* cv Blondy non inoculato. Assenza di sintomi. **B:** *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculato. Mostra sintomi di avvizzimento batterico. **C:** *Solanum commersonii* inoculato. Assenza di sintomi.

3.3.2 Analisi MicroArray del chip di pomodoro

3.3.2.1 Categorizzazione funzionale dei geni differenzialmente espressi

L'elaborazione statistica dei dati trascrittomici, è stata effettuata mediante un'analisi di tipo SAM (Significance Analysis of Microarrays) che ha consentito l'identificazione di un totale di 248 geni differenzialmente espressi ottenuti da una serie di confronti effettuati nei campioni analizzati. Nella tabella 3.9 A sono descritti i vari tipi di confronti effettuati per i campioni ottenuti a 72 ore dall'inoculazione. In questa analisi sono state messe a confronto le radici (inoculate e non inoculate) con le foglie più i fusti (inoculati e non inoculati) di *S.*

commersonii e di *S. tuberosum* cv Blondy (confronti 2 e 4), non identificando alcun gene differenzialmente espresso. Sono poi stati confrontati i trascritti derivanti dalle radici (incolate e non incolate) e dai fusti più le foglie (incolati e non incolati) di *S. commersonii* con quelli di *S. tuberosum* cv Blondy (confronti 7 e 8). In entrambi i casi non sono stati identificati geni differenzialmente espressi.

Successivamente sono stati confrontati i geni trascritti in piante di *S. commersonii* (radici e foglie più fusti) incolate con quelli delle piante non incolate, ottenendo un totale di 39 geni (confronto 1). Lo stesso tipo di analisi è stato effettuato per le piante di *S. tuberosum* cv Blondy identificando 94 geni (confronto 3). Infine, sono stati paragonati i profili di espressione delle piante incolate di *S. commersonii* (radici e foglie più fusti) con quelli di *S. tuberosum* cv Blondy (radici e foglie più fusti) (confronto 5). Lo stesso tipo di confronto è stato effettuato dal materiale vegetale non inoculato (confronto 6). Sono così stati ottenuti 42 e 58 geni differenzialmente espressi, rispettivamente.

Nella figura 3.5 A è rappresentato il diagramma di Venn in cui sono messi in evidenza i geni comuni tra i vari confronti.

Tabella 3.9 A Schematizzazione dei risultati ottenuti dall'analisi dei dati trascrittomici effettuata in otto diversi confronti a 72 ore dall'inoculazione. F, foglie e fusti; R, radici; CMM, *Solanum commersonii*; BLO, *Solanum tuberosum* cv Blondy, NI, non inoculato; I, inoculato; delta, valore di delta ottenuto dell'analisi statistica.

n° confronto	Tipo di confronto	Repliche	delta	geni diff. espressi
1	CMM I vs CMM NI	R+F	0.365	39
2	CMM F vs CMM R	NI+I	0.201	0
3	BLO I vs BLO NI	R+F	0.339	94
4	BLO F vs BLO R	NI+I	0.14	0
5	CMM I vs BLO I	R+F	0.519	42
6	CMM NI vs BLO NI	R+F	0.479	58
7	CMM R vs BLO R	NI+I	0.186	0
8	CMMF vs BLO F	NI+I	0.218	0
	Totale			233

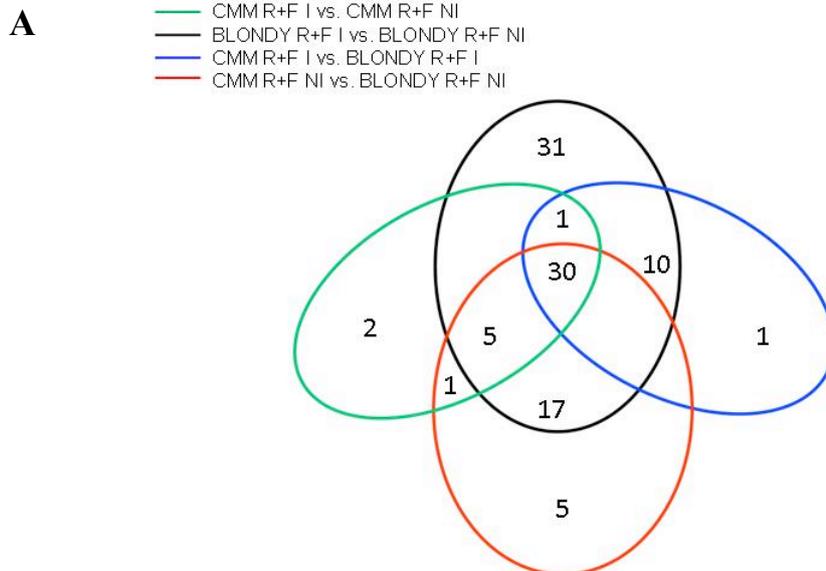
Per quanto riguarda i profili trascrizionali dei campioni prelevati sei giorni dopo l'inoculazione sono stati effettuati tre tipi di confronti. Nel primo sono stati confrontati i trascritti presenti nelle radici (incolate e non incolate) con quelli presenti nelle foglie più i fusti (incolati e non incolati) di *S. commersonii*

(confronto 2), identificando sette geni differenzialmente espressi. Il secondo tipo di confronto ha riguardato l'analisi dei geni differenzialmente espressi nei fusti più le foglie (inoculate e non inoculate) tra *S. commersonii* e *S. tuberosum* cv Blondy (confronto 3), ottenendo quattro geni. Nell'ultimo confronto sono stati analizzati i trascritti differenzialmente presenti tra piante di *S. commersonii* (foglie più fusti e radici) inoculate e le stesse piante non inoculate, individuando quattro geni (confronto 1). Nella tabella 3.9 B sono descritti i tipi di confronti effettuati per i campioni ottenuti a sei giorni dall'inoculazione e nella figura 3.5 B è rappresentato il diagramma di Venn in cui sono messi in evidenza i geni comuni tra i vari confronti.

Tabella 3.9 B Schematizzazione dei risultati ottenuti dall'analisi dei dati trascrittomici effettuata tra vari confronti a sei giorni dall'inoculazione. F, foglie e fusti; R, radici; CMM, *Solanum commersonii*; BLO, *Solanum tuberosum* cv Blondy; NI, non inoculato; I, inoculato; delta, valore di delta ottenuto dell'analisi statistica.

n° confronto	Tipo di confronto	Repliche	delta	geni diff. espressi
1	CMM I vs CMM NI	R+F	3.1	4
2	CMM F vs CMM R	NI+I	3.43	7
3	CMM F vs BLO F	NI+I	1.26	4
Totale				15

Il totale dei geni differenzialmente espressi individuati (Appendici 1 e 2) se non si prendono in considerazione i geni comuni tra i vari confronti sono 46 (rappresentano circa il 6% di tutte le *probe* presenti sul chip) (figura 3.5 A e B).



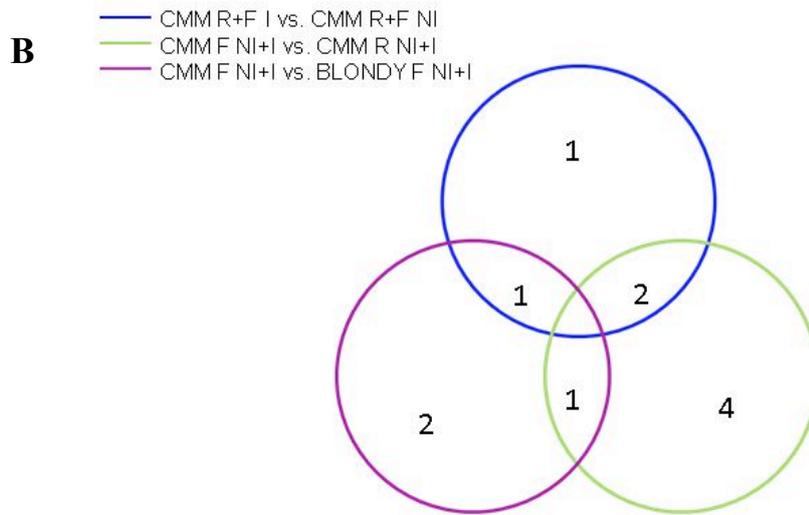
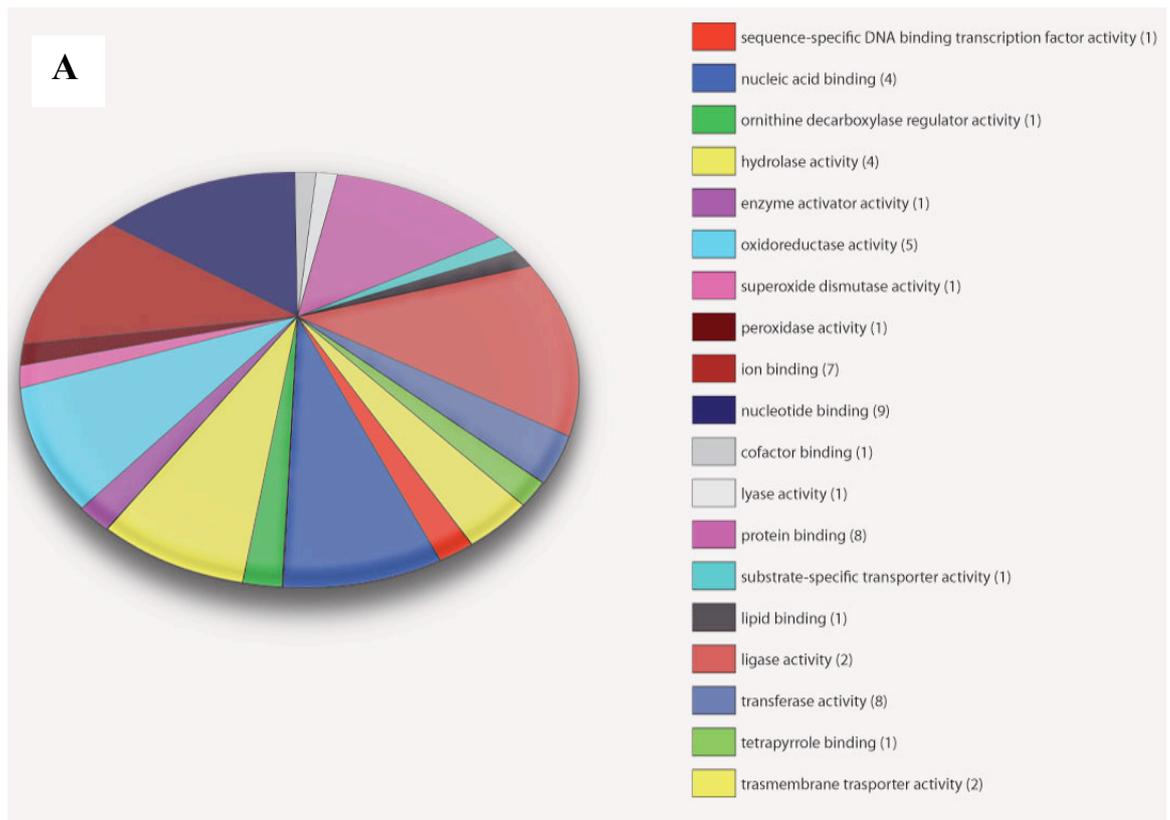


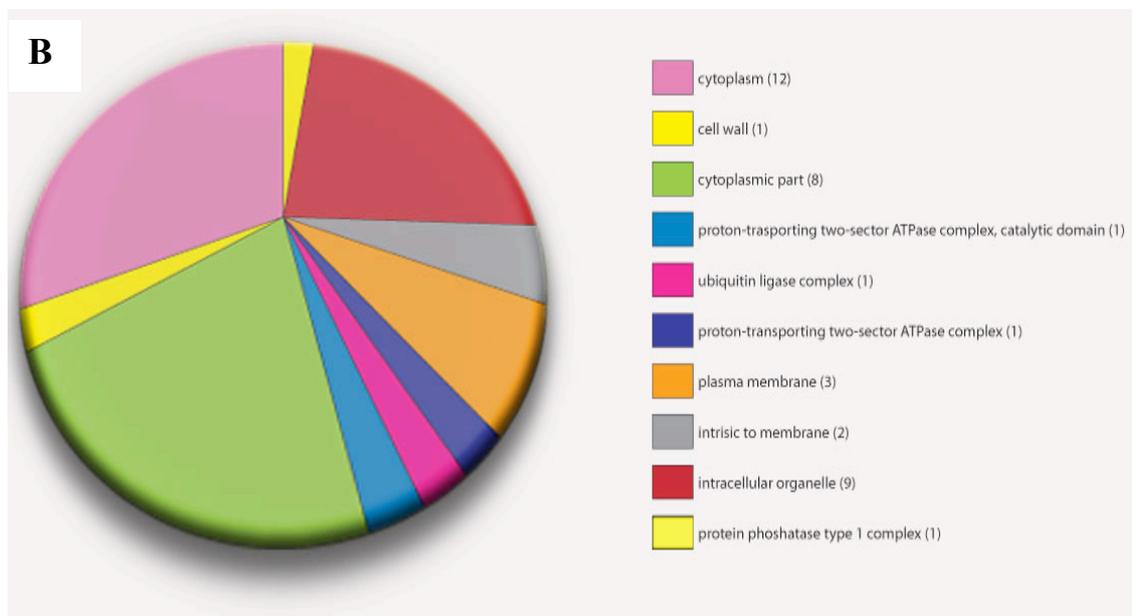
Figura 3.5 Diagramma di Venn realizzato con i dati ottenuti dalle diverse analisi in cui sono evidenziati i geni comuni ottenuti tra i diversi confronti. **A:** dati ottenuti a 72 ore dall'inoculazione. **B:** dati ottenuti a 6 giorni dall'inoculazione. F, foglie e fusti; R, radici; CMM, *Solanum commersonii*; BLO, *Solanum tuberosum* cv Blondy; NI, non inoculato; I, inoculato.

I geni che hanno mostrato un livello di espressione differenziale sono stati categorizzati per Gene Ontology (figura 3.6 A, B, C) secondo le tre categorie: Funzione Molecolare, Processo Biologico e Compartimento Cellulare. Tra i geni maggiormente rappresentati nella categoria Funzione Molecolare (figura 3.6 A) ci sono geni che codificano per ligandi degli acidi nucleici (9%) ligandi di proteine (8%) e proteine con attività tranferasica (8%). Nella categoria Processi Biologici (figura 3.6 C) invece le classi maggiormente rappresentate sono quelle che includono geni coinvolti in processi metabolici cellulari (30%), di risposta a stimoli chimici (10%) e di risposta a stress (7%). Relativamente alla Componente Cellulare (figura 3.6 B) circa il 20% dei geni codifica per proteine localizzate nel citoplasma, il 9% per proteine localizzate negli organelli intracellulari ed il 3% sulla membrana plasmatica.

Molecular Function



Cellular Component



Biological Process

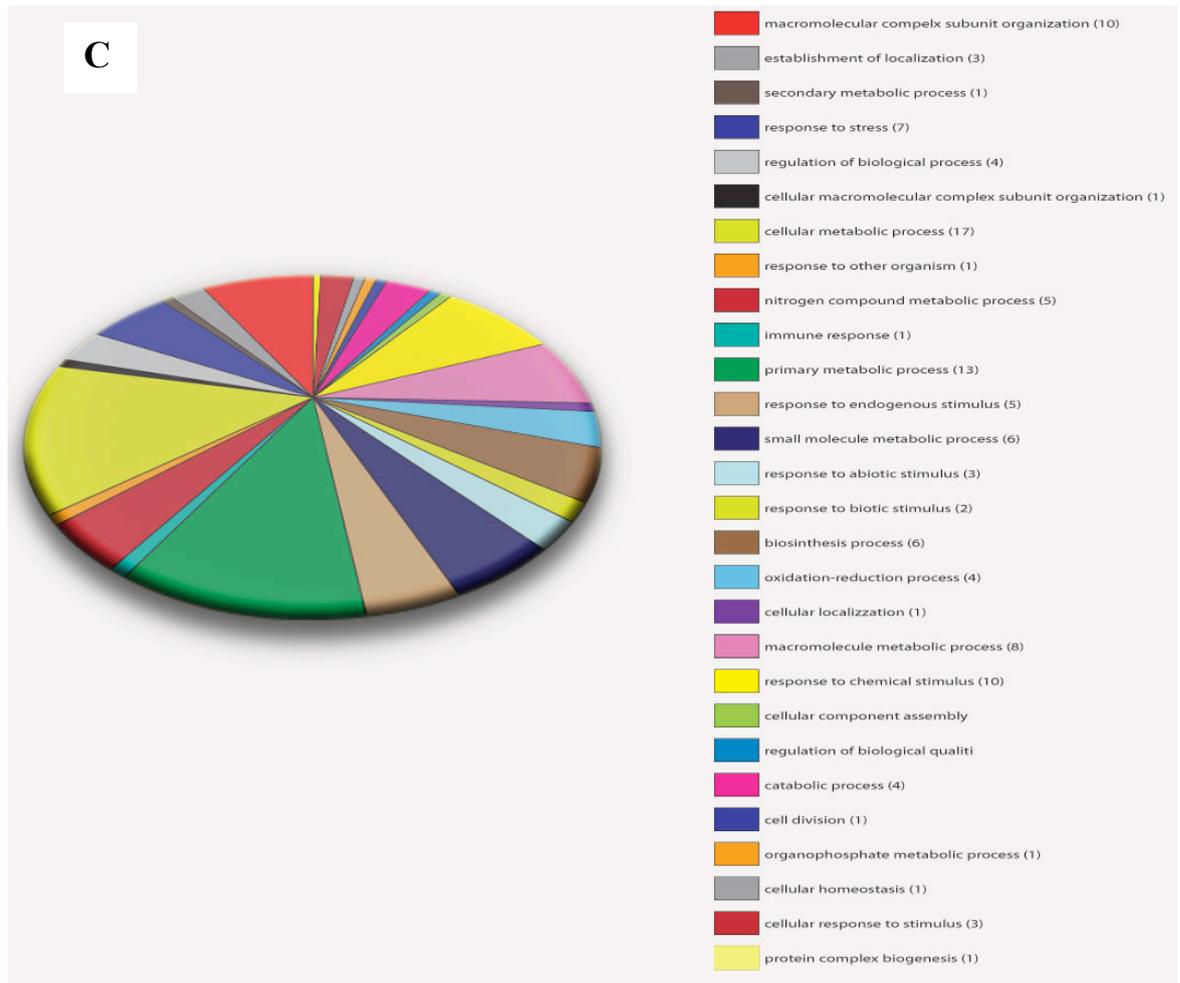


Figura 3.6 Categorizzazione dei geni differenzialmente espressi ottenuti dal chip di pomodoro. I corrispondenti termini di Gene Ontology sono classificati secondo le tre categorie. **A:** Molecular Function; **B:** Cellular Component; **C:** Biological Process.

3.3.3 Analisi MicroArray del chip di patata

3.3.3.1 Categorizzazione funzionale dei geni differenzialmente espressi

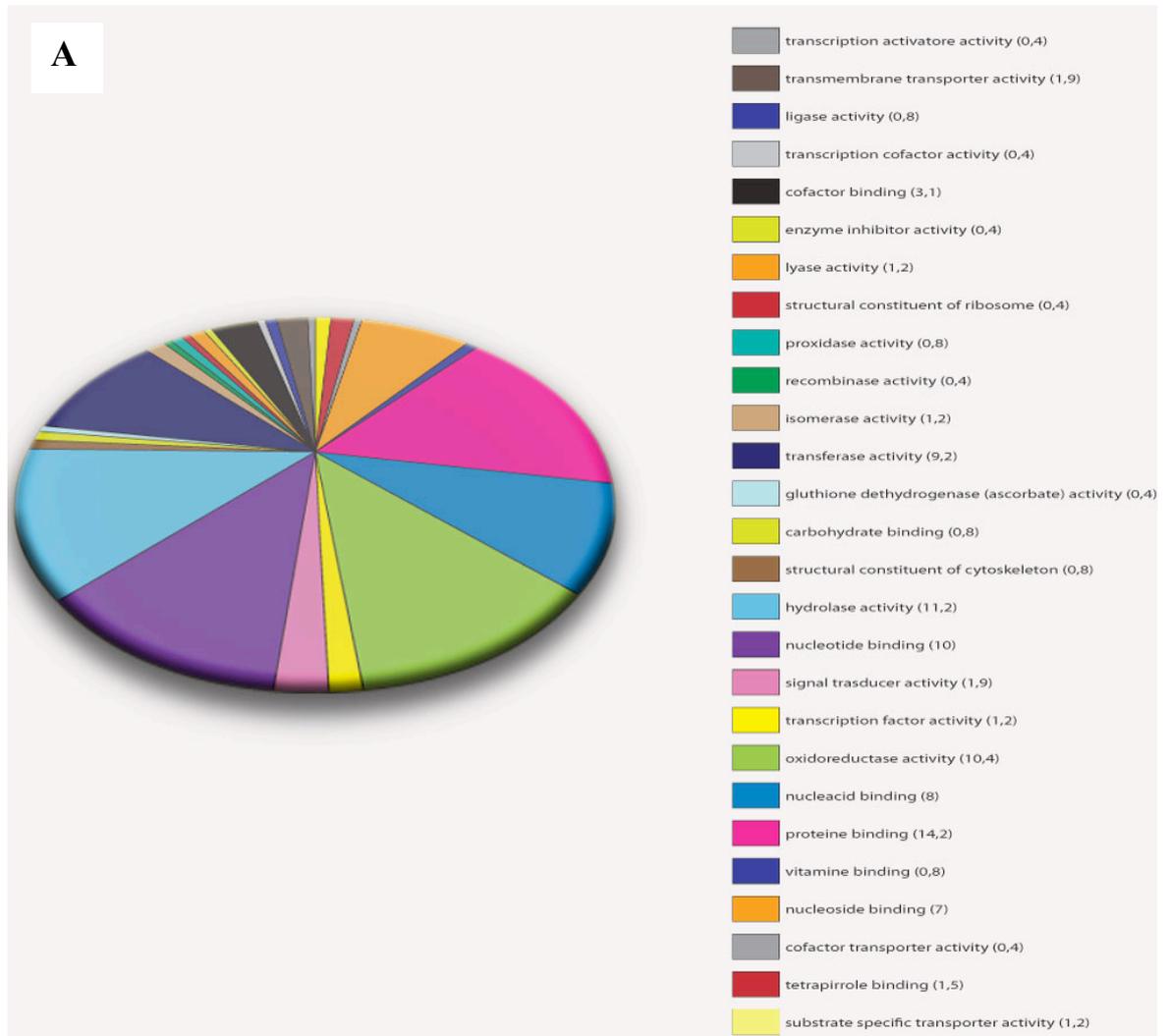
L'elaborazione statistica dei dati trascrittomici mediante l'utilizzo di un test Anova a due fattori (inoculati e non inoculati) ha permesso di identificare 256 geni con un segnale di espressione significativamente differente tra il trascrittoma di *S. commersonii* (foglie più fusti e radici) infettato e non con *R. solanacearum* sei giorni dopo l'inoculazione. I 256 trascritti rappresentano circa l'1% di tutte le *probe* presenti sul chip (Appendice 3).

In particolare, 116 geni sono risultati sovraespressi e 140 sottoespressi. I geni che hanno mostrato un livello di espressione differenziale tra le piante di *S.*

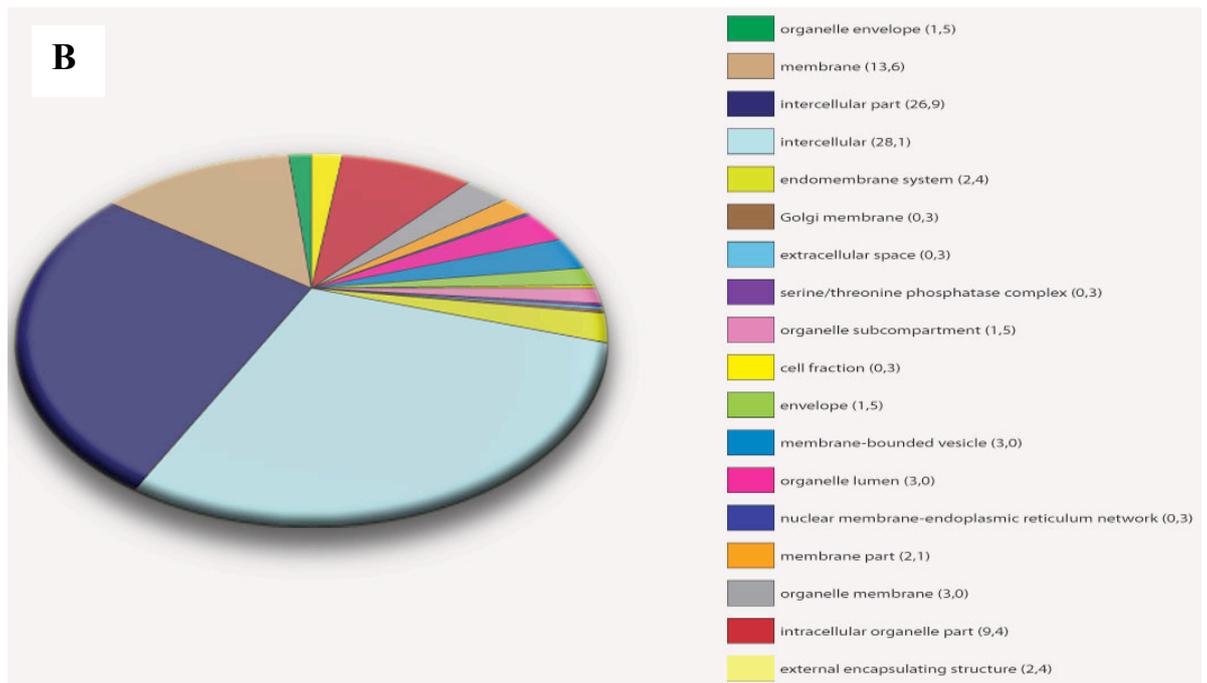
commersonii inoculate e non, sono stati categorizzati per Gene Ontology (figura 3.7 A, B, C) secondo le tre categorie: Funzione Molecolare, Processo Biologico e Compartimento Cellulare.

Tra i geni maggiormente rappresentati nella categoria Funzione Molecolare (figura 3.7 A) ci sono geni che codificano per ligandi di proteine (14,2%), proteine con attività idrolitica (11,2%) e ossido-riduttiva (10,4%) e ligandi degli acidi nucleici (10%). Nella categoria Processi Biologici (figura 3.7 C) invece le classi maggiormente rappresentate sono quelle che includono geni coinvolti in processi biologici e cellulari (circa il 50%) e di risposta a stimoli esogeni (11%). Relativamente alla Componente Cellulare (figura 3.7 B) più del 50% dei geni codifica per proteine localizzate in compartimenti intracellulari ed il 13% sulla membrana.

Molecular Function



Cellular Component



Biological Process

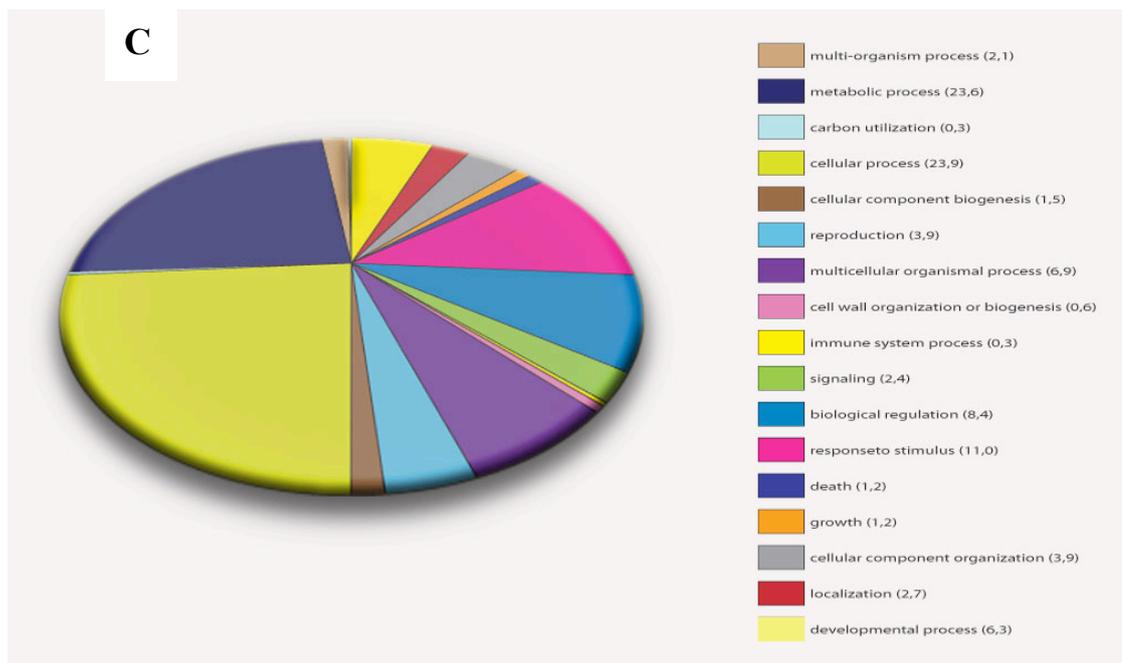


Figura 3.7 Categorizzazione di 256 geni differenzialmente espressi ottenuta dalla comparazione trascrittomico di piante di *Solanum commersonii* inoculate e non inoculate sei giorni dopo l'infezione. I corrispondenti termini di Gene Ontology sono classificati secondo le tre categorie **A**: molecular function, **B**: cellular component, **C**: biological process.

I geni risultati differenzialmente espressi sono stati analizzati con il database PRG (<http://prgdb.cbm.fvg.it/>) per verificare la presenza di domini conservati caratteristici dei geni di resistenza. Per 23 trascritti (di cui dieci sotto-regolati e 13 sopra-regolati) è stato trovato un dominio di resistenza nel database (tabella 3.10 e 3.11).

Tali sequenze sono state successivamente analizzate per verificare la posizione cromosomica sul genoma di pomodoro e sui superscaffold di patata. Tali informazioni sono state ottenute utilizzando il database del Sol Genomics Network (tabella 3.10 e 3.11). Dall'analisi effettuata è risultato che tutti i geni sono localizzati in specifici cromosomi di pomodoro e superscaffold di patata fatta eccezione per il solo id_396, per il quale non è stato possibile attribuire una localizzazione nei due genomi analizzati. Tra i geni presi in considerazione solo due coppie presentano la stessa posizione cromosomica in pomodoro e patata. Queste sono la coppia costituita dai geni codificanti per una proteina chinasi (id_3573) e un'aldo-chetoreductasi (id_6518), presenti sul cromosoma 9 di pomodoro e superscaffold 21 di patata, e la coppia costituita dai geni codificanti una proteina di resistenza di tipo nbs (id_20436) ed una proteina di resistenza di tipo nbs-llr (id_8064), localizzati sul cromosoma 6 di pomodoro e sul superscaffold 222 di patata.

Tabella 3.10. Sintesi dei geni sotto-regolati catalogati in base alla localizzazione sui cromosomi di pomodoro (L.C.P.) e superscaffold di patata (S.G.P.) e alla presenza di omologia di sequenza sul PRG database.

id gene	L.C.P.	S.G.P.	Database PRG	Annotazione
id_10968	11	17	presente	cyclin dependent kinase a
id_12897	2	4	presente	NSP-interacting kinase [Glycine max]
id_20223	1	277	presente	Interleukin-1 receptor-associated kinase, putative [Ricinus communis]
id_23734	10, 11, 12	56,69, 549, 745, 956	presente	nbs-coding resistance gene analog
id_8471	9	702	presente	electron transport SCO1/SenC family protein [Arabidopsis thaliana]
id_11192	3 e varie	20	presente	NA
id_16047	3	26	presente	wall-associated kinase, putative [Ricinus communis]
id_3479	7	37	presente	glyoxalase bleomycin resistance protein dioxygenase
id_4363	7	302	presente	THE1 (THESEUS1); kinase/ protein kinase [Arabidopsis thaliana]
id_5341	7 e varie	76	presente	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140

Tabella 3.11. Sintesi dei geni sopra-regolati catalogati in base alla localizzazione sui cromosomi di pomodoro (L.C.P.) e superscaffod di patata (S.G.P.) e alla presenza di omologia di sequenza sul PRG database.

id gene	L.C.P.	S.G.P.	Database PRG	Annotazione
id_20436	6	222	presente	nbs-coding resistance gene analog
id_3573	9	21	presente	protein kinase [Solanum tuberosum]
id_4411	4	322	presente	unknown [Glycine max]
id_571	1	862	presente	pft1 (phytochrome and flowering time 1) transcription coactivator
id_818	1	210	presente	ralf precursor
id_10805	10	018 e 876	presente	monooxygenase FAD-binding
id_11205	3	142	presente	rhodanese-like family protein
id_13914	9	267	presente	polygalacturonase inhibitor
id_171	1	136, 450, 214	presente	Calmodulin
id_236	4	184	presente	patatin t5
id_396	-	-	presente	novel protein with a thioesterase superfamily domain
id_6518	9	21	presente	aldo keto reductase family protein
id_8064	6	222	presente	nbs-lrr resistance protein

3.3.3.2 Co-regolazione dei geni differenzialmente espressi

Allo scopo di identificare gruppi di trascritti co-regolati è stata effettuata l'analisi "Relevance Network Analysis" mediante l'utilizzo del software TMEV. Questo tipo di analisi mette in correlazione, basandosi sull'analisi statistica dei dati, i livelli di espressione dei geni sotto-regolati e sopra-regolati, creando delle reti o network i cui nodi rappresentano i geni ed i ponti che collegano i vari i nodi rappresentano le associazioni esistenti tra loro. I ponti di colore rosso mettono in connessione geni che tra loro hanno una correlazione positiva, mentre i ponti di colore blu mettono in connessione geni che tra loro hanno una correlazione negativa. Nelle reti sono raggruppati anche geni con funzione ignota (indicati come NA) fornendo la possibilità di formulare ipotesi di funzione per geni non ancora annotati. Attraverso questa analisi è stato possibile individuare diversi network di espressione.

Nella figura 3.8 è rappresentata la prima rete individuata dal programma, nella quale il gene (id_11401) codificante per il fattore di trascrizione indotto da stress GRAS2 presenta una correlazione positiva con il gene codificante per l'enzima oxophytodienoate reductasi (id_8272), coinvolto nella biosintesi dell'acido jasmonico, e con un gene codificante per una glicosiltransferasi (id_22969), enzima chiave nella sintesi della parete secondaria delle piante. Questi tre geni presentano una correlazione negativa con un gene codificante per una proteina della famiglia MATE (multi antimicrobial extrusion protein) (id_8958), il quale a sua volta è correlato positivamente con un gene a funzione ignota (id_6285).

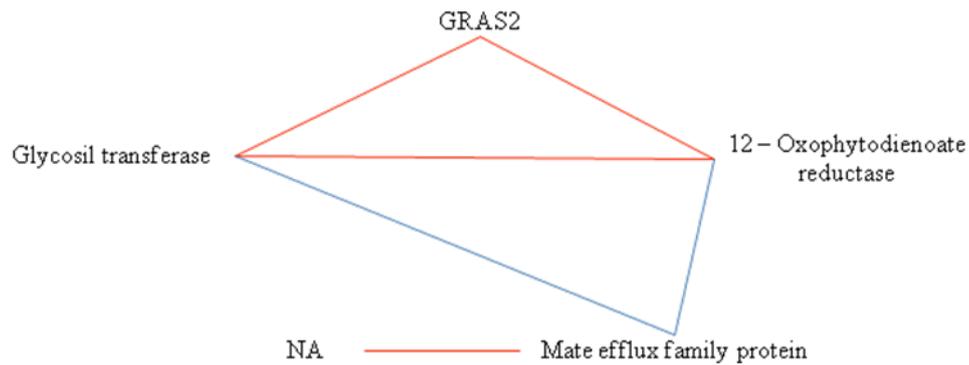


Figura 3.8 Geni coregolati nel network 1 ottenuto dalla Relevance Network Analysis mediante il software TMEV.

Il secondo network (figura 3.9) possiede una struttura più complessa rispetto al precedente. Esso è costituito da due geni (id_16144, id_19967) che codificano per proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina (una istone deacetilasi e una proteina con un dominio di tipo bromo) e di un gene codificante per un enzima coinvolto nella sintesi della lisina (id_8978). Vi è poi un gene che codifica per una proteina che lega gli acidi nucleici (id_21558) ed una proteina contenente il dominio RAN (id_3500), che è coinvolto nel trasporto dell'RNA nel nucleo e nella sintesi del DNA. Sono presenti anche una serie di geni codificanti per proteine che sono coinvolte in meccanismi di risposta a stress; come il gene codificante per una proteina gs-1 like (id_17118), espressa durante lo stress salino, il gene codificante per una proteasi di tipo subtilasi (id_8430), coinvolta in meccanismi di difesa e di formazione dei fasci vascolari nella pianta, ed infine il gene codificante per la proteina CPL1 (id_5208), che regola l'attivazione di geni di risposta a ferita ed all'acido abscissico (ABA). Sono infine presenti una serie di geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (id_12897, id_11159, id_15283) ed un gene codificante per una proteina coinvolta nella fosforilazione ossidativa (id_7280).

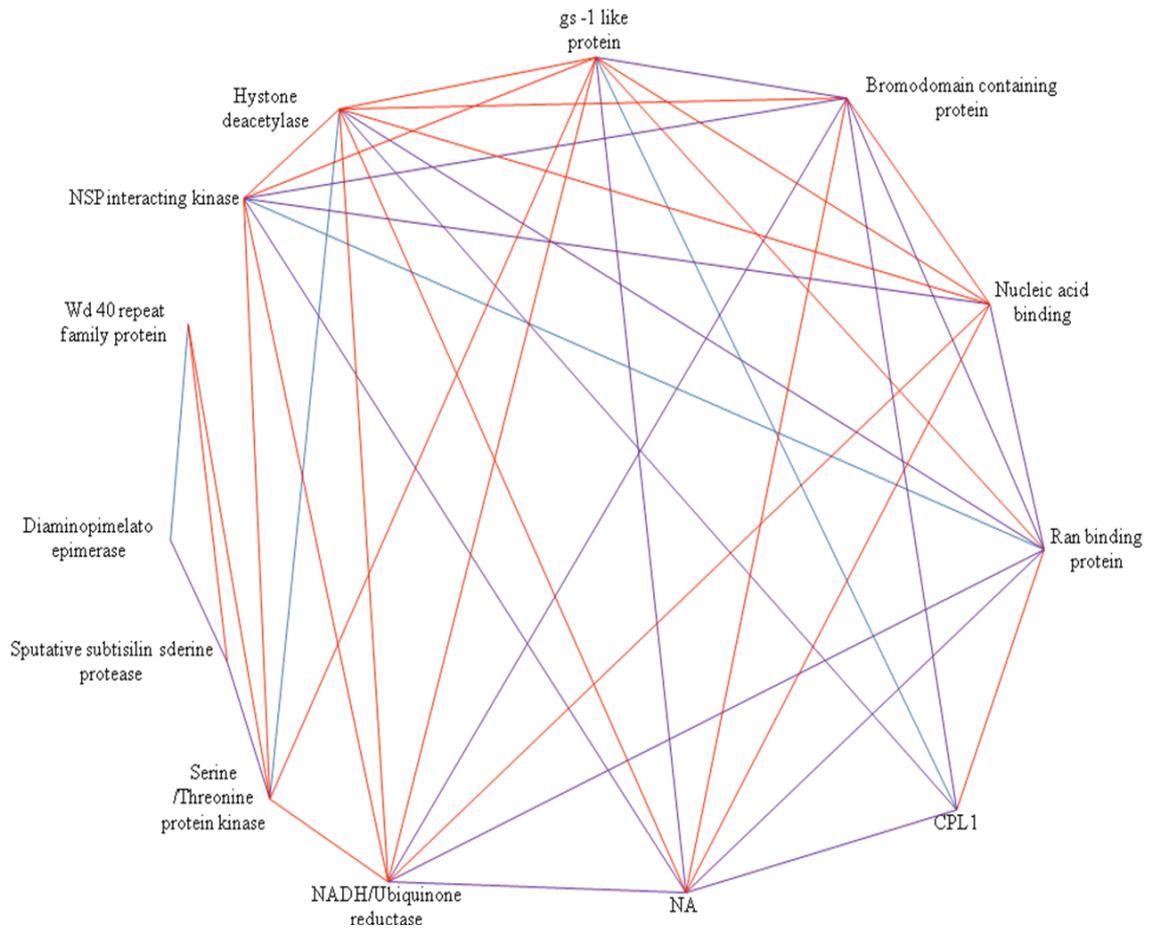


Figura 3.9. Geni coregolati nel network 2 ottenuto dalla Relevance Network Analysis mediante il software TMEV.

Il terzo network (figura 3.10) è quello costituito dal maggior numero di geni e coinvolti in differenti processi biologici. Possiamo individuare un gruppo di geni a cui è possibile attribuire un ruolo nel meccanismo di resistenza a stress biotici ed abiotici. Tale gruppo è costituito dai geni codificanti per una chinasi associata al recettore interleuchina 1 (id_20223), per una proteina di tipo Ptf1(id_571) (phytocrome and flowering time 1), la cui espressione è mediata dall'acido jasmonico ed è indotta in situazioni di stress, per un trasportatore di tipo ABC (id_19255) e per una proteina ricca in glicina la cui espressione è indotta da stress di tipo idrico (id_6987). Vi sono poi una serie di geni coinvolti in differenti processi ; come ad esempio nel rimodellamento della cromatina (id_14951) e nel turnover e riparazione del DNA (id_21342).

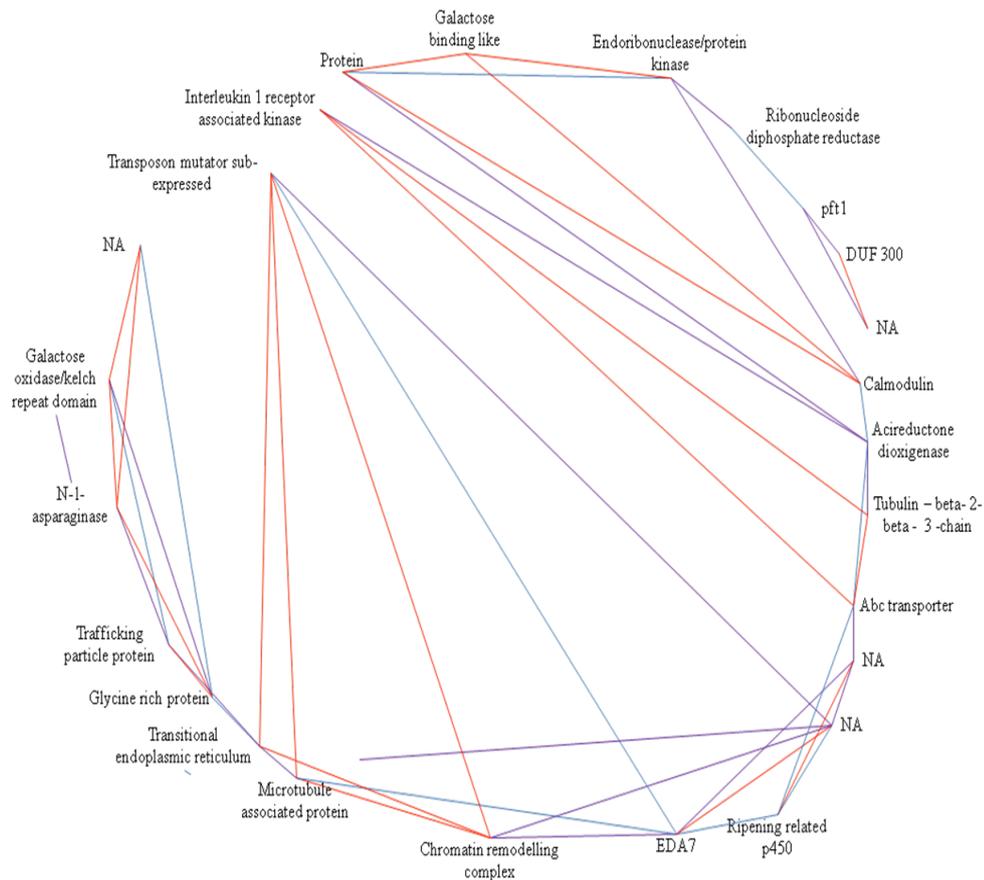


Figura 3.10. Geni coregolati nel network 3 ottenuto dalla Relevance Network Analysis mediante il software TMEV.

3.3.4 Validazione mediante RT-qPCR dei risultati

Per la validazione mediante RT-qPCR dei dati ottenuti dall'ibridazione con i chip di patata e pomodoro, sono stati selezionati 31 geni.

Quindici di questi geni (per maggiori dettagli vedere tabella 3.8) sono stati selezionati dal chip di pomodoro, e tra questi solo due (DV104592 e DV104327) non sono risultati differenzialmente espressi nell'analisi microarray. Altri 11 geni sono invece stati selezionati tra quelli differenzialmente espressi ottenuti dall'ibridazione sul chip di patata secondo i seguenti criteri:

- tre presentavano omologia di sequenza con geni di resistenza nel PGR database (id_12897, id_20223, id_23734);
- tre sono stati selezionati dai geni sovraespressi e sottoespressi (id_19255, id_23180, id_18196);

- cinque presentavano omologia di sequenza con geni presenti sul chip di pomodoro (id_ 8141, id_11159, id_8978, id_4363, id_11401). Essi sono stati selezionati tra quelli presenti nella tabella 3.12, dove sono descritti i risultati ottenuti dall'allineamento tra i geni differenzialmente espressi ottenuti utilizzando il chip di patata ed i geni utilizzati per disegnare il chip di pomodoro. Questa analisi ha permesso l'individuazione di geni differenzialmente espressi di patata presenti anche nella collezione di EST provenienti dall'esperimento di PCR select effettuato sulla cv Hawaii 7996 di pomodoro. Su un totale di 116 EST di patata sovraesprese e 140 sottoesprese, tre e nove sono risultate omologhe con le suddette sequenze, rispettivamente. Di questi dodici geni solo DV104743 e DV104695 risultavano differenzialmente espressi anche nel chip di pomodoro.

I restanti cinque [quattro codificanti per le proteine PR (pathogenesis related) Pr-1a, Pr-1b, osmotina e GluA ed uno per una proteina appartenente alla famiglia delle remorine] non sono risultati differenzialmente espressi nell'analisi microarray in nessuno dei due chip, ma sono stati descritti avere un ruolo chiave nell'interazione pianta/*R. solanacearum* in precedenti lavori (Milling *et al.*, 2011, Sylvain *et al.*, 2009).

Tabella 3.12. Sintesi dei risultati ottenuti dall'allineamento tra i geni differenzialmente espressi di patata con i quelli presenti sul chip di pomodoro. +, sovraespressi, - sottoespressi, np, dato non pervenuto.

id gene chip patata	EST patata	EST pomodoro	esp. diff. patata	esp. diff. pomodoro	lunghezza allineamento	annotazione
id_38	000015_8F	DV104580	+	np	505	deidrina
id_5568	007025_2F	DV105002	+	np	107	PFT1 (phytocrome and flowering time)
id_11401	013867_1F	DV104596	+	np	131	TF GRAS2 family
id_11159	013540_1F	DV104627	-	np	359	serina-treonina chinasi
id_8978	009936_1F	DV104743	-	+	491	diaminopimelate epimerase
id_10995	013299_1F	DV104695	-	-	464	heat shock protein
id_21342	031824_1F	DV104416	-	np	471	ribonucleotide reductasi
id_4363	005924_1F	DV104453	-	np	430	THE1 (Theseus 1) protein kinase
id_8141	009164_1C	DV104621	-	np	440	conserved hypothetical protein
id_8736	009673_2F	DV104449	-	np	101	UV excision repair protein RAD23

L'analisi RT-qPCR è stata effettuata sui campioni di *S. commersonii* a 72 ore (foglie/fusti e radici) e 6 giorni (foglie/fusti e radici) dall'inoculazione, di *S. tuberosum* cv Blondy a 72 ore (foglie/fusti e radici) e a 6 giorni (radici) dall'inoculazione, e dagli stessi campioni non inoculati. Per ciascun tessuto e time

point dei due genotipi è stata misurata l'espressione relativa dei geni nei campioni inoculati rispetto a quelli non inoculati.

Per i geni selezionati dal chip di pomodoro l'analisi RT-qPCR ha dato risultati positivi solo per le EST DV104592 e DV104327 (non risultate differenzialmente espresse dall'analisi microarray), codificanti rispettivamente per una proteina a funzione ignota e per una chinasi appartenente alla famiglia pfkb. Il gene DV104327 (figura 3.11 A) è infatti risultato sottoespresso in tutti i campioni analizzati, fatta eccezione per le foglie più fusti di *S. tuberosum* cv Blondy e le radici di *S. commersonii* sei giorni dopo l'inoculazione. Il gene DV104592 (figura 3.11 B) è invece risultato sottoespresso solo nel genotipo *S. tuberosum* cv Blondy.

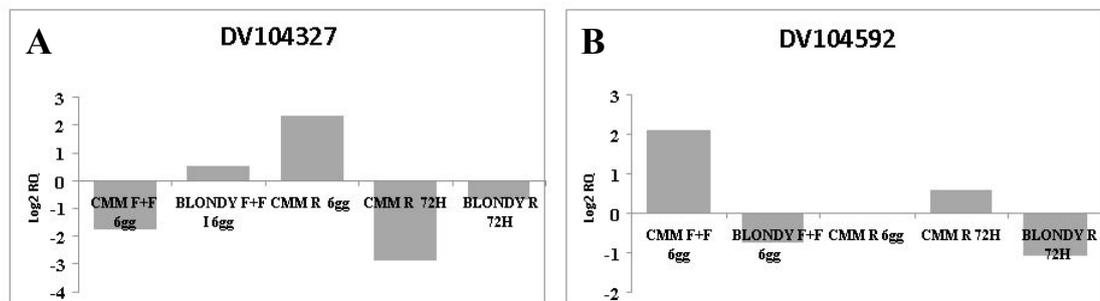


Figura 3.11. Validazione dell'espressione mediante qRT-PCR di: un gene codificante per una chinasi appartenente alla famiglia pfkb (A) ed un gene codificante per una proteina a funzione ignota (B). I dati sono espressi in log₂ delle quantità relative. CMM F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculo; BLONDY F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 6 gg: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 72 h: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate 72 ore dall'inoculazione; BLONDY R 72 h: radici di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 72 ore dall'inoculazione.

I risultati dell'analisi RT-qPCR effettuata sul secondo gruppo di geni (ovvero quelli che mostrano omologia di sequenza con geni di resistenza presenti nel PRG database) sono riassunti nella figura 3.12 (A, B e C). Il gene id _12897, codificante per una NSP-interacting kinase (NIK), è risultato sotto-espresso, sebbene a livelli differenti, in ogni genotipo e time-point analizzato (figura 3.12 A). Il gene id_20223 codificante per una chinasi associata al recettore interleuchina-1 è risultato sottoespresso in entrambi i genotipi ed a tutti i time-point analizzati, fatta eccezione per le radici di *S. tuberosum* cv Blondy 72 ore dopo l'inoculazione (figura 3.12 B). Il gene di resistenza di tipo NBS id_23734,

infine, è risultato sovraespresso in tutte le condizioni eccetto nelle radici di *S. commersonii* 72 ore post-inoculazione (figura 3.12 C).

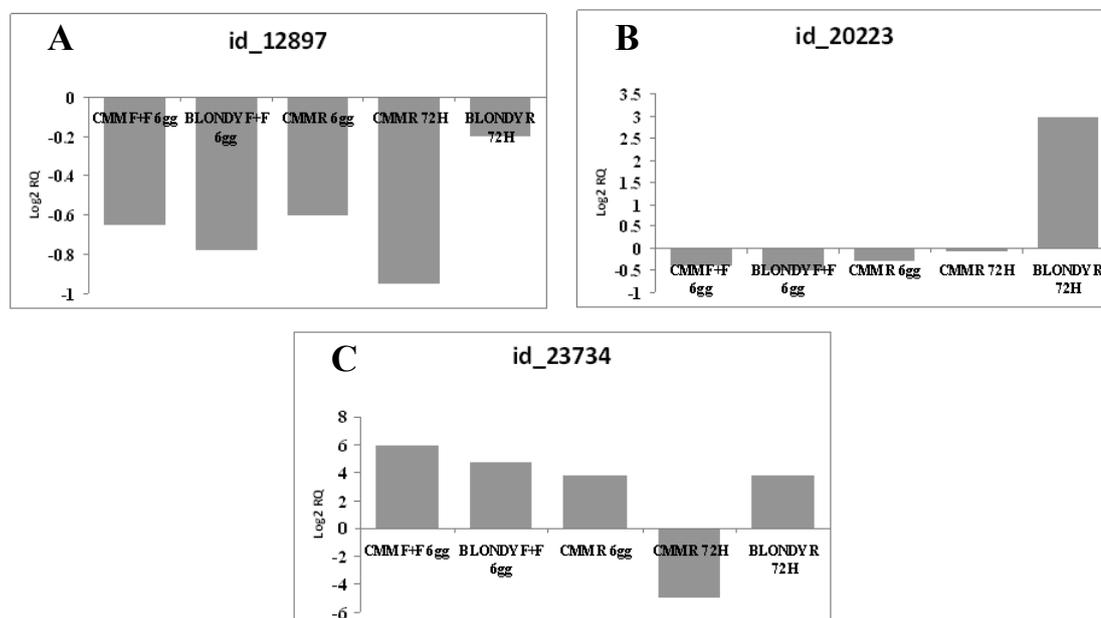


Figura 3.12. Validazione dell'espressione mediante qRT-PCR di: un gene codificante per una chinasi di tipo NIK (A), un gene codificante per una chinasi associata al recettore interleuchina-1 (B), un gene di resistenza di tipo NBS (C). I dati sono espressi in log₂ delle quantità relative. CMM F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; BLONDY F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 6 gg: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 72 h: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate 72 ore dall'inoculazione; BLONDY R 72 h: radici di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 72 ore dall'inoculazione.

Per il terzo gruppo di geni (costituito da geni scelti tra quelli risultati differenzialmente espressi nell'esperimento microarray di patata) i risultati dell'analisi RT-qPCR sono riassunti nella figura 3.13 (A, B, C). A questo gruppo appartengono il gene codificante per SRFR1 (id_23180), un gene codificante per un trasportatore di tipo ABC (id_19255) ed il gene codificante per una proteina di resistenza PSH-RGH6 (id_18196). Mediante l'analisi RT-qPCR è stato possibile osservare che il gene id_23180 è risultato sovraespresso in tutte le condizioni esaminate (figura 3.13 A), a differenza dei geni id_19255 ed id_18196. Questi ultimi due sono infatti risultati sottoespressi in tutte le condizioni ad eccezione delle radici di *S. tuberosum* cv Blondy 72 ore dopo l'inoculazione per il primo

(figura 3.13 B) e delle radici di *S. commersonii* e *S. tuberosum* cv Blondy 72 ore dopo l'inoculazione per i secondo (figura 3.13 C).

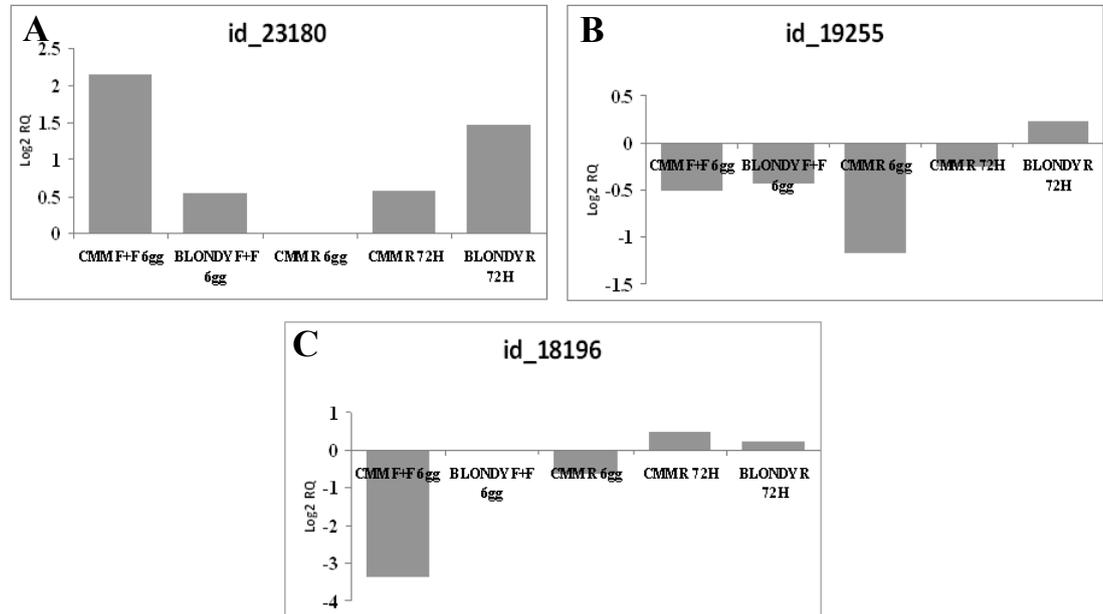


Figura 3.13. Validazione dell'espressione mediante qRT-PCR di: un gene codificante per SRFR1 (A), un gene codificante per un trasportatore di tipo ABC (B) del gene codificante per una proteina di resistenza PSH-RGH6 (C). I dati sono espressi in log₂ delle quantità relative. CMM F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; BLONDY F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 6 gg: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 72 h: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate 72 ore dall'inoculazione; BLONDY R 72 h: radici di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 72 ore dall'inoculazione.

Per il quarto gruppo di geni (id_8141, id_11159, id_8978, id_4363, id_11401) (ovvero quelli che presentano omologia di sequenza con geni presenti sul chip di pomodoro) i risultati dell'analisi RT-qPCR sono riassunti nella figura 3.14 (A, B, C, D e E). A tale gruppo appartengono il gene codificante per una proteina a funzione ignota (id_8141), il gene che codifica per una chinasi di tipo serina treonina (id_1159), il gene che codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle diammino pimelato epimerasi (id_8978), il gene codificante per una proteina chinasi di tipo THE1 (id_4363), dotata di un dominio caratteristico dei geni di resistenza (tabella 3.10), ed il gene codificante per la proteina GRAS2 (id_11401). Dall'analisi RT-qPCR il gene id_8141 è risultato sottoespresso in tutti i time point e genotipi analizzati ad eccezione delle radici di *S. commersonii*

prelevate a sei giorni dall'inoculazione (figura 3.14 A). Risultati simili sono stati ottenuti per il gene id_11159, che è risultato sovraespresso solo nelle radici di *S. commersonii* e di *S. tuberosum* cv Blondy sei e tre giorni dopo l'inoculazione, rispettivamente (figura 3.14 D). Nel caso del gene id_8978, invece, i trascritti sono risultati indotti, anche se con diversa intensità, in tutti i time point e genotipi analizzati (figura 3.14 C). Il gene id_4363 è risultato sempre sovraespresso, eccetto nelle radici e nelle foglie più i fusti di *S. commersonii* sei giorni dopo l'inoculazione (figura 3.14 B). Il gene id_11401 è risultato infine sovraespresso in entrambi i genotipi e nei time-point considerati fatta eccezione per le radici di *S. tuberosum* cv Blondy 72 ore dopo l'inoculazione (figura 3.14 E).

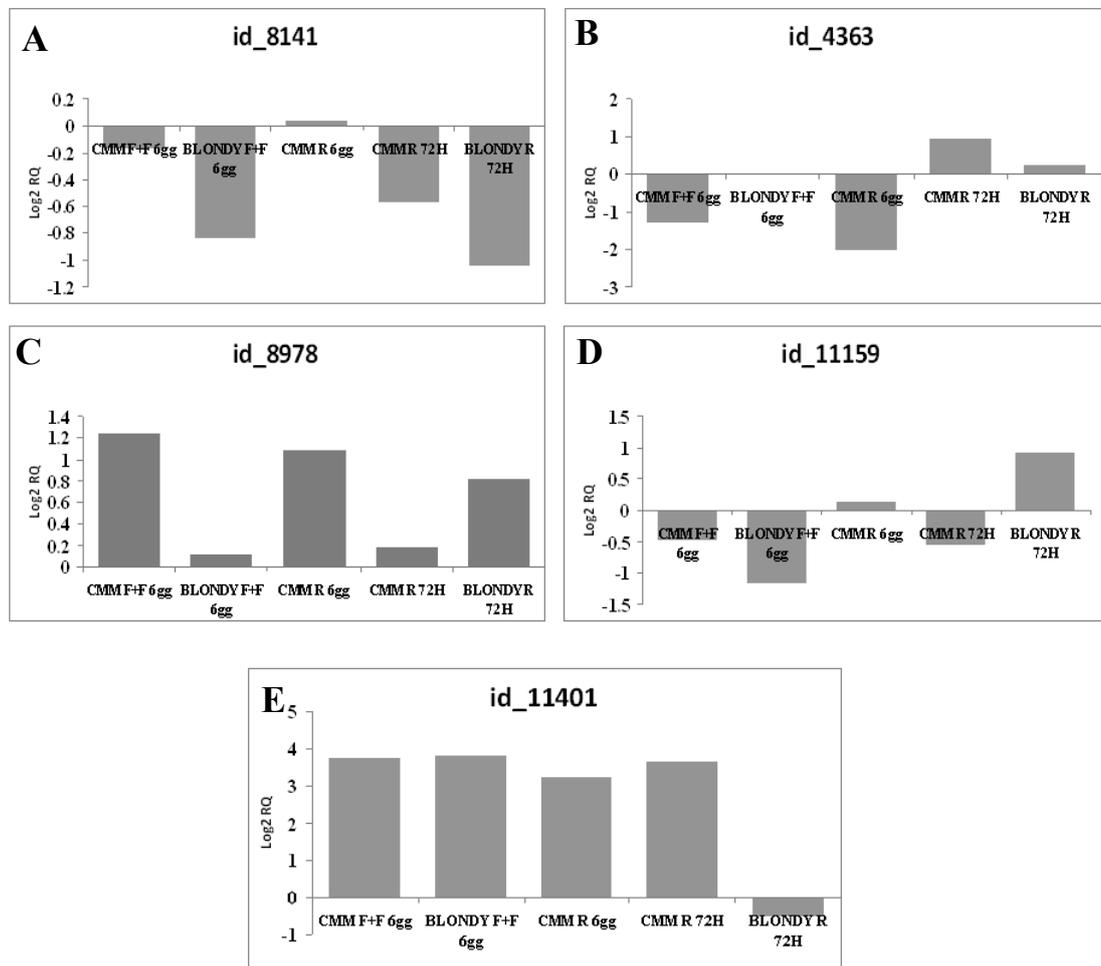


Figura 3.14. Validazione dell'espressione mediante qRT-PCR di: un gene con funzione ignota (A), un gene codificante per una una proteina chinasi di tipo THE1 (B), un gene codificante per una proteina appartenente alla famiglia delle diammino pimelato epimerasi (C), un gene che codifica per una proteina di tipo serina treonina chinasi (D), un gene che codifica per la proteina GRAS2 (E). I dati sono espressi in log2 delle quantità relative. CMM F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; BLONDY F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 6 gg: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 72 h: radici di piante di *Solanum commersonii*

inoculate vs non inoculate 72 ore dall'inoculazione; BLONDY R 72 h: radici di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 72 ore dall'inoculazione.

Per quanto riguarda il quinto gruppo sono stati presi in considerazione quattro geni codificanti per proteine PR (pathogenesis related) Pr-1a, Pr-1b, osmotina e GluA ed un gene codificante per una proteina appartenente alla famiglia delle remorine. Mediante l'analisi RT-qPCR è stato possibile osservare che il gene codificante per la Pr-1b risulta sempre sovraespresso ad eccezione delle radici di *S. commersonii* a sei giorni dall'inoculazione (figura 3.15 A). Al contrario il gene codificante per la Pr-1a è sempre sottoespresso tranne in *S. commersonii* sei giorni dopo l'inoculazione (figura 3.15 B). I geni codificanti per l'osmotina (figura 3.15 C) e la glucanasi GluA (figura 3.15 D) sono risultati sovraespressi in tutte le condizioni analizzate, fatta eccezione per le radici di *S. commersonii* 72 ore dopo l'inoculazione dove il gene *Osm* era sottoregolato. In contrasto la remorina è risultata sempre sottoespressa fatta eccezione per le radici di *S. commersonii* 72 ore dopo l'inoculazione (figura 3.15 E).

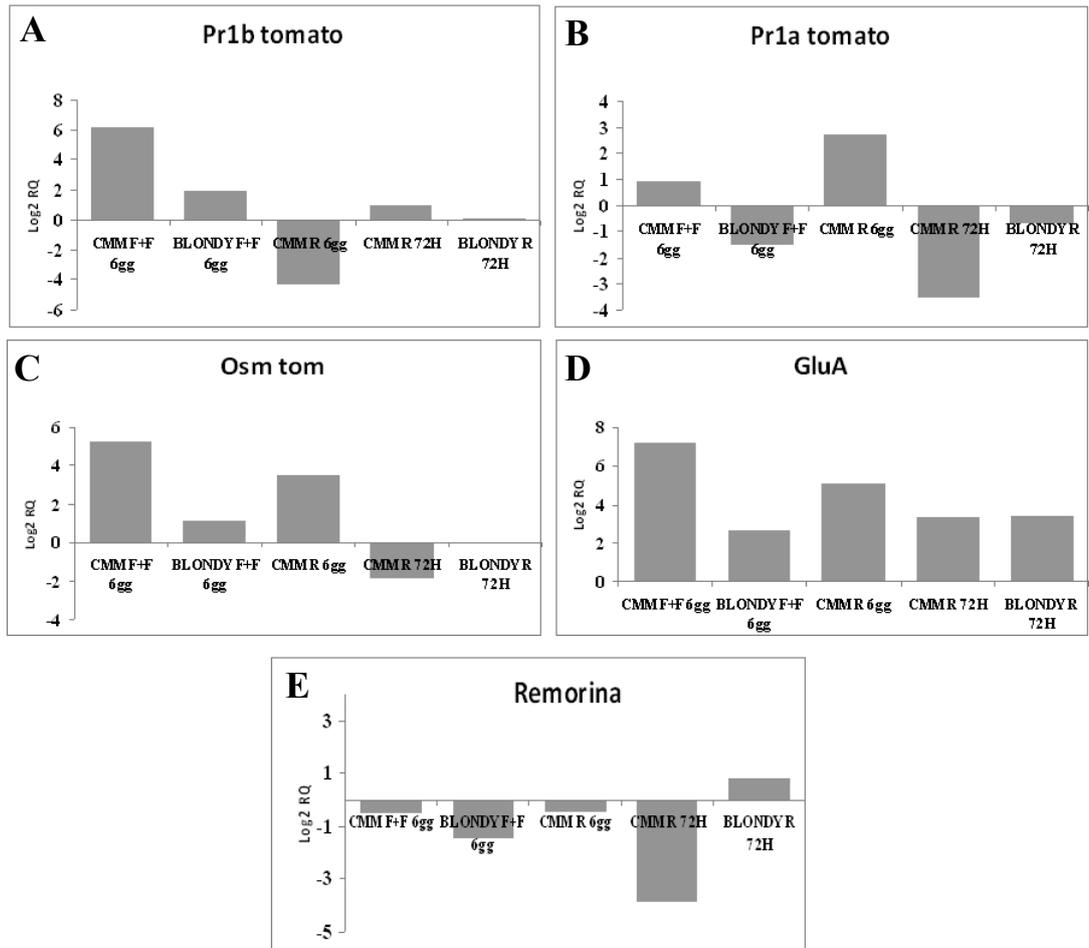


Figura 3.15. Validazione dell'espressione mediante qRT-PCR di: un gene codificante la Pr-1b (A), per la Pr-1a (B), per l'osmotina (C), per GluA (D) e per una proteina appartenente alla famiglie delle remorine (E). I dati sono espressi in log₂ delle quantità relative. CMM F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; BLONDY F+F 6 gg: foglie e fusti di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 6 gg: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate a 6 giorni dall'inoculazione; CMM R 72 h: radici di piante di *Solanum commersonii* inoculate vs non inoculate 72 ore dall'inoculazione; BLONDY R 72 h: radici di piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculate vs non inoculate a 72 ore dall'inoculazione.

3.4 Discussione

R. solanacearum (razza 3), l'agente causale dell'avvizzimento batterico, è estremamente dannoso per le colture di patata e di altre solanacee. Nonostante esso sia in Europa un batterio da quarantena, si è recentemente diffuso nel nostro continente e la sua presenza è stata riportata in molti paesi europei (Genin *et al.*, 2002; Van der Wolf *et al.*, 1998). Per questo motivo negli ultimi anni numerosi studi sono stati focalizzati sull'identificazione di geni e di QTL di resistenza a tale patogeno.

Ad oggi, sono ancora scarse le conoscenze sulla base genetica e molecolare dell'interazione incompatibile che si instaura tra la pianta e *R. solanacearum*. Nonostante ciò, un cospicuo numero di geni e QTL di resistenza sono già stati identificati in differenti specie vegetali. Tra questi i geni di resistenza *RRS1* di *A. thaliana* (Deslandes *et al.*, 1998) e *API* di patata (Feng *et al.*, 2003), ed i QTL di resistenza *BW-1*, *BW-3*, *BW-4*, *BW-5*, *Bwr-3*, *Bwr-4*, *Bwr-6* e *Bwr-8* di pomodoro (Carmeille *et al.*, 2006; Thoquet *et al.*, 1996). Uno degli approcci utilizzati al fine di ottenere piante di patata resistenti a questo patogeno è stato quello di utilizzare tecniche di trasformazione genetica. Con questo intento, ad oggi sono state trasformate piante di *S. tuberosum* con vari geni candidati, ma solo un esiguo numero di questi, tra cui *snakin-1* e *snakin-2* sono risultati efficaci nell'aumentare il livello di resistenza (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

Approcci di trascrittomica su larga scala, specialmente quelli in cui si paragonano i profili trascrizionali di varietà di patata resistenti e suscettibili durante i vari stadi dell'infezione, possono rappresentare uno strumento utile nella comprensione dei meccanismi molecolari attivati durante l'interazione pianta-patogeno e nell'individuazione di geni putativamente coinvolti nel fenomeno della resistenza. In questo lavoro, mediante l'utilizzo di due chip microarray (uno contenente sequenze EST di pomodoro e l'altro di patata) sintetizzati con tecnologia CombiMatrix, è stato analizzato il trascrittoma di diversi tessuti della specie di patata resistente *S. commersonii* (Le Ferriere *et al.*, 1999) e di quella suscettibile *S. tuberosum* cv Blondy, a vari tempi dall'inoculazione con il batterio *R. solanacearum*. Il primo dei due chip utilizzati è stato ottenuto sintetizzando 658 sonde oligonucleotidiche corrispondenti ad altrettante sequenze EST di

pomodoro. Tali EST sono state selezionate dal TomatEST database perchè risultate differenzialmente espresse nella cultivar Hawaii 7996 di *S. lycopersicum*, resistente a *R. solanacearum*, così come evidenziato in un esperimento di PCR select condotto sulle radici ed il colletto di queste piante 24 e 48 ore dopo l'inoculazione con il batterio. L'utilità di questo chip è stata quella di verificare l'esistenza di geni differenzialmente espressi durante l'interazione incompatibile pianta-patogeno che siano comuni ai due patosistemi pomodoro-*Ralstonia* e patata-*Ralstonia*. Il secondo chip utilizzato è stato ottenuto sintetizzando 24928 sonde oligonucleotidiche corrispondenti ad altrettante sequenze EST di patata presenti nel PotatEST database.

Entrambi i chip utilizzati sono stati ibridati con RNA isolato da piante di patata inoculate e non con il batterio. A causa della scarsità di informazioni bibliografiche riguardanti i meccanismi relativi alla resistenza della specie selvatica di patata *S. commersonii*, una resistenza che non è associata, come spesso accade, con lo sviluppo di una risposta di ipersensibilità (HR), è stato impossibile predire il lasso di tempo durante il quale l'interazione occorreva. Considerando che i primi sintomi di avvizzimento batterico appaiono in *S. tuberosum* cv Blondy (genotipo suscettibile) alle 72 dall'inoculazione, radici e foglie/fusti di entrambe le specie di patata sono stati prelevate a questo time point, assumendo che i primi cambi nell'espressione genica nelle piante resistenti dovrebbero occorrere durante le prime 72 ore. Inoltre, si è scelto di campionare lo stesso materiale biologico anche sei giorni dopo l'inoculazione, al fine di identificare l'eventuale risposta della pianta anche in uno stadio più avanzato della malattia. La scelta di prelevare sia le radici che le foglie ed i fusti delle piante di patata è stata dettata dalla volontà di identificare differenze nell'espressione genica tra l'interazione di tipo suscettibile o resistente che potessero essere ristrette solo a specifici tessuti della radice o della parte epigea della pianta. Lo studio del trascrittoma dell'apparato radicale di piante di patata a seguito dell'infezione con *R. solanacearum* costituisce un approccio del tutto innovativo poichè nonostante questo batterio sia un patogeno terricolo la maggior parte degli studi dell'interazione *Ralstonia*-pianta ospite sono stati effettuati sulle parti aeree della pianta. Ciò è dovuto alle difficoltà esistenti nel prelevare i tessuti radicali

infetti che risultano spesso non accessibili o troppo danneggiati dal patogeno per poter essere utilizzati (Hu *et al.*, 2008).

Sono stati inizialmente comparati i *pattern* di espressione genica globale delle piante di *S. tuberosum* cv Blondy infettate con quelli delle piante asintomatiche di *S. commersonii* utilizzando i chip di pomodoro. Un numero maggiore di geni (39, corrispondenti al 5,9% delle sonde sintetizzate sul chip) è risultato differenzialmente espresso quando si paragonavano piante di *S. commersonii* inoculate con le stesse piante non inoculate durante i primi stadi dell'infezione (72 ore dopo l'inoculazione) (tabella 3.9 A) rispetto agli stadi successivi (4 geni, corrispondenti allo 0,6% delle sonde sintetizzate sul chip) (tabella 3.9 B). Un numero lievemente maggiore di geni (94 geni, pari al 14% delle sonde sintetizzate sul chip) è invece risultato differenzialmente espresso quando si confrontavano le piante di *S. tuberosum* inoculate con quelle controllo, 72 ore dopo l'inoculazione. Poichè gran parte dei geni differenzialmente espressi è risultato coinvolto nella risposta a vari tipi di stress (17%) (figura 3.6 C), è possibile ipotizzare che il maggior numero di geni differenzialmente regolati nel genotipo suscettibile rispetto a quello resistente possa essere dovuto ad un tipo di risposta generale attivato della pianta e non relazionato con il fenomeno della resistenza. Vari autori hanno infatti suggerito l'esistenza di due meccanismi di difesa paralleli nelle piante, uno più specifico relazionato con la presenza dei geni di resistenza (nelle piante resistenti) ed uno generale (presente in entrambe piante resistenti e suscettibili) (Lambert *et al.*, 1999). Secondo questa ipotesi sarebbe possibile osservare l'attivazione di un elevato numero di geni di difesa non specifici nelle piante suscettibili, mentre l'induzione di un numero minore di geni specifici e la concomitante non induzione o repressione dei geni di risposta generale si può ipotizzare nell'interazione incompatibile. Dati che supportano quest'ipotesi sono stati forniti da Brenner e collaboratori (1998), i quali hanno osservato uguali livelli di induzione genica di perossidasi, chitinasi, lipossigenasi e inibitori di proteasi indipendentemente dalla presenza di geni di resistenza durante l'interazione pomodoro- *Meloidogyne javanica*.

Un ulteriore confronto effettuato utilizzando i dati ottenuti dall'ibridazione del chip di pomodoro è stato quello tra i vari organi (radici vs. foglie più fusti) delle due specie prese in considerazione e tra i genotipi (radici *S. tuberosum* vs. radici

S. commersonii; foglie/fusti *S. tuberosum* vs. foglie/fusti *S. commersonii*) per poter verificare l'entità della variazione trascrizionale associata a queste due variabili. In entrambi i tipi di confronti non sono stati identificati geni differenziali 3 giorni dopo l'inoculazione, mentre un limitato numero di geni è stato identificato sei giorni dopo l'inoculo quando si confrontavano i vari organi (7 geni) o i due genotipi (4 geni) (tabella 3.9 A e B). Considerando che le sequenze nucleotidiche sintetizzate sul chip di pomodoro derivavano da EST differenzialmente espresse durante l'infezione con il patogeno questi risultati non sono così sorprendenti.

In generale è da notare che per tutti i confronti analizzati, quando è stato utilizzato il chip di pomodoro, è stato identificato solo un ridotto numero di geni differenzialmente regolati. Ad esempio quando si paragonano i geni differenzialmente espressi a 72 ore dall'inoculazione ottenuti dalle piante di *S. tuberosum* cv Blondy inoculate e dalle piante di *S. commersonii* inoculate e non (vedere diagramma di Venn; figura 3.5 A) si può notare che dei 39 geni risultati differenzialmente espressi nel secondo confronto la maggior parte (36 geni) sono risultati comuni anche al primo confronto. Le ragioni della bassa efficienza dei chip utilizzati possono essere dovute alla:

- lunghezza delle sonde oligonucleotidiche utilizzate (35-mer). Essendo infatti i microarray basati sull'ibridazione dell'aRNA alle probe presenti sul chip solo i trascritti che presentano un'elevata omologia di sequenza con le probes possono essere identificati mediante questo sistema.
- ridotta omologia di sequenza tra i trascritti di patata e le sequenze EST di pomodoro utilizzate per sintetizzare le sonde del chip 4x 2K.

Una possibile evidenza che la ridotta omologia di sequenza possa aver contribuito ad una bassa efficienza di rilevamento dei trascritti di patata è fornita dagli studi di RT-qPCR utilizzati per poter validare i risultati ottenuti dall'analisi microarray. In questo caso, dei tredici geni risultati differenzialmente espressi nell'analisi microarray, non è stato possibile amplificarne nessuno quando si utilizzavano su cDNA di patata coppie di primer disegnate sulle EST di pomodoro. Per poter ovviare ai problemi potenzialmente legati alla bassa omologia di sequenza esistente tra le due specie sono stati disegnati ed utilizzati chip di patata. Questi

ultimi sono stati ibridati con RNA estratto da *S. commersonii* (foglie/fusti e radici) infettato e non a sei giorni dall'inoculazione. In questo caso il numero di geni differenzialmente espressi tra le due condizioni analizzate è risultato maggiore (256 geni) rispetto a quello ottenuto quando si utilizzavano i chip di pomodoro, anche se corrisponde solo all'1% di tutte le sonde sintetizzate sul chip di patata. Bisogna però considerare che su questo chip sono presenti un numero molto maggiore di sonde (24928 sonde) rispetto a quelle presenti sul chip di pomodoro (658 sonde, che costituiscono solo un 2,6% delle sonde sintetizzate sul chip di patata).

Dall'ibridazione del chip di patata è stato possibile evidenziare che un elevato numero di geni, che risultano differenzialmente espressi durante l'infezione di *S. commersonii* prendono parte in processi metabolici e cellulari nonché nella risposta a vari tipi di stimoli (figura 3.7 C). Tale risultato non è così sorprendente se si considera che spesso i geni associati con lo sviluppo della malattia sono anche correlati alla risposta a vari tipi di stress. Alcuni dei cambi nell'espressione genica osservati nella pianta inoculata risultano essere relazionati con l'acido abscissico (ABA) e la senescenza. Alcuni esempi sono costituiti dai geni codificanti per: il recettore dell'etilene (id_23919), la proteina SAG101 (*senescence associated gene 101*) (id_14719), l'enzima oxophytodienoate reductasi (id_8272), una proteina appartenente alla famiglia zinc finger (*C3HC4-type RING finger*) (id_12188), una proteina della famiglia *mate efflux* (id_8958), una proteina appartenente alla famiglia wd-40 (id_15283) ed una proteina F-box (id_15112). Di questi, gli ultimi quattro geni sono stati recentemente riportati anche da Hu e collaboratori (2008) essere differenzialmente espressi in piante di *Arabidopsis* a seguito dell'infezione con *R. solanacearum*. Un'ulteriore conferma del coinvolgimento del pathway dell'ABA è data dai risultati dell'analisi "Relevance Network Analysis", che evidenzia in un primo network (figura 3.8) la possibile coregolazione del gene codificante per l'enzima 12-Oxo-Phytodienoate acid reductase, enzima chiave del metabolismo biosintetico del Jasmonato (Turner *et al.*, 2002), con il fattore di trascrizione indotto da stress GRAS2 (Bolle, 2004; Fode *et al.*, 2008) e la proteina della famiglia *mate efflux*, indotta dal trattamento con ABA (Hu *et al.*, 2008). Un secondo network di geni risultati coregolati dalla stessa analisi (figura 3.9) comprende geni coinvolti in meccanismi di risposta a

stress; come il gene (id_17118) codificante per la proteina *gs1* (*germin like polypeptide*) espressa nelle radici a seguito di stress salino (Hurkman *et al.*, 1991), una subtilasi (id_8430) coinvolta in meccanismi di difesa e di formazione dei fasci vascolari nella pianta (Turrà e Lorito, 2011), la proteina specifica delle piante CPL1 (id_5208), che interagisce con fattori di trascrizione indotti da stress abiotici e ABA (Bang *et al.*, 2008) ed una proteina appartenente alla famiglia wd-40 (id_15283), indotta dal trattamento con ABA (Hu *et al.*, 2008). Nel terzo network (figura 3.10) sono infine presenti geni che possiedono un ruolo nella resistenza a stress biotici ed abiotici, tra cui una chinasi appartenente alla famiglia delle chinasi associate al recettore interleuchina 1 (id_20223), coinvolte nella percezione delle MAMPs (Danna *et al.*, 2011), una proteina di tipo Ptf1 (id_571) (*phytocrome and flowering time 1*), coinvolta nella regolazione genica mediata dall'acido jasmonico (Kidd *et al.*, 2009), un trasportatore di tipo ABC (id_19255), indotto da patogeni fungini e batterici, tra cui lo stesso *R. solanacearum* (Campbell *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2008), ed una proteina ricca in glicina (id_6987) la cui espressione è indotta da stress di tipo idrico (Nicolas *et al.*, 1997). L'insieme di questi risultati indicano una chiara regolazione, nelle piante di *S. commersonii* infettate con *R. solanacearum*, di geni indotti dall'ABA e coinvolti nella risposta a stress biotici ed abiotici, come ad esempio lo stress idrico. Essendo *R. solanacearum* un patogeno vascolare in grado di determinare l'ostruzione dei fasci vascolari e l'avvizzimento della pianta, il progredire della malattia può risultare in un più scarso approvvigionamento di acqua e conseguente stress idrico. Per questo motivo non risulta sorprendente che i profili di espressione genica che si ottengono durante l'infezione con questo patogeno risultino simili a quelli indotti dall'ABA. L'ABA è infatti coinvolto nella regolazione di vari processi fisiologici, tra cui la chiusura degli stomi, la dormienza delle gemme e dei semi, la risposta al freddo, la siccità, e lo stress salino (Shinozaki *et al.*, 2003).

Risultati simili a quelli da noi ottenuti sono stati osservati anche da Hu e collaboratori (2008), i quali hanno notato che 143 dei geni identificati come sovraespressi durante l'interazione *Arabidopsis thaliana-R. solanacearum* risultavano coinvolti nella biosintesi e segnalizzazione dell'ABA. Gli stessi autori hanno in aggiunta osservato che circa il 40% dei geni regolati durante l'infezione

risultava comune a geni indotti in germinelli di *Arabidopsis* trattati con questo fitoormone e che il 37% corrispondeva a geni differenzialmente espressi in piante senescenti.

Dalla suddivisione dei geni differenzialmente espressi ottenuti dal chip di patata in classi funzionali (figure 3.7 A, B, C), una cospicua porzione di geni è inoltre risultata associata a vari processi di sviluppo (6,3%), suggerendo che il normale processo di sviluppo della pianta risulta fortemente colpito durante l'infezione. Se i geni differenzialmente espressi vengono suddivisi sulla base della loro funzione molecolare è possibile notare che esistono due classi di geni maggiormente rappresentate: i geni codificanti per proteine con attività idrolitica, potenzialmente utili alla pianta nel contrastare l'avanzata del patogeno e quelli codificanti per proteine che legano gli acidi nucleici, come ad esempio i fattori di trascrizione utili nel riprogrammare il processo trascrizionale durante l'evolversi dell'interazione incompatibile pianta-patogeno.

Per poter validare la bontà dei dati ottenuti sono stati selezionati 15 geni presenti sul chip di patata e la loro espressione è stata osservata nei campioni di *S. tuberosum* e *S. commersonii* inoculati e non con *R. solanacearum*, mediante analisi RT-qPCR. I confronti tra i risultati dei microarray e delle RT-qPCR hanno mostrato profili di espressione generalmente comuni per gran parte dei geni studiati (fatta eccezione per i soli id_18196, id_8978, id_23734), almeno per uno dei due tessuti analizzati (radici o fusti) indicando che questi esperimenti di microarray possono costituire uno strumento utile per selezionare geni candidati potenzialmente coinvolti nella resistenza a *R. solanacearum* in patata. I geni codificanti per il recettore associato all'interleuchina 1 (id_20223) ed un trasportatore di tipo ABC (id_19255), che da lavori precedenti risultavano coinvolti nella risposta a stress biotici (Campbell *et al.*, 2003; Danna *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2008), hanno mostrato un profilo di espressione simile. Essi sono infatti risultati sottoregolati nel genotipo resistente e sovraespressi in *S. tuberosum* solo a 72 ore dall'inoculazione, indicando di poter costituire dei componenti della risposta generale e aspecifica della pianta al patogeno.

In generale le variazioni nell'espressione genica osservate sono risultate maggiori nelle radici del genotipo suscettibile rispetto a quello resistente a 72 ore dall'inoculazione. In *S. commersonii*, infatti, l'espressione genica 3 giorni dopo

l'inoculazione era più simile a quella osservata in entrambe i genotipi negli stadi più avanzati dell'infezione (vedi id_20223, id_19255, id_11159, id_11401, id_12897, remorina). E' possibile quindi speculare che nel genotipo resistente *S. commersonii* la risposta al patogeno risulta essere più rapida rispetto a quella mostrata dal genotipo suscettibile, come già indicato in precedenza per altri patosistemi (Williams and Cooper, 2003).

Per quanto riguarda infine i geni che non sono risultati differenzialmente espressi nell'analisi microarray ma che risultavano avere un ruolo chiave nell'interazione pomodoro/*R. solanacearum* nel precedente studio di Milling e collaboratori (2011) sorprendentemente in patata solo il gene GluA è risultato sovraespresso in tutte le condizioni analizzate.

Nella loro totalità questi dati illustrano la complessità dei processi associati con lo sviluppo della malattia. Questo studio nonostante sia lontano dall'essere esaustivo, ha fornito una visione generale sulla natura dell'interazione patata-*Ralstonia*. Le EST riportate in questo studio possono costituire dei dati utili per aumentare le conoscenze sui meccanismi di resistenza messi in atto dalla patata nei confronti dei patogeni e possono essere utilizzati come geni candidati per lo sviluppo di marcatori molecolari per assistere il miglioramento genetico della patata.

4 Conclusioni generali

Nella presente tesi di dottorato sono stati studiati i due patosistemi *R. solanacearum*-patata e *A. fabae*-fava sfruttando metodologie differenti, basate su approcci di genomica strutturale e funzionale.

E' stato possibile per la prima volta ottenere in patata risultati derivanti dallo studio dell'espressione genica durante il processo infettivo di *R. solanacearum* mediante analisi microarray. Da tale analisi è stato possibile ottenere una visione globale dei geni e dei pathway metabolici regolati durante l'interazione incompatibile *S. commersonii*-*R. solanacearum* e compatibile *S. tuberosum* cv Blondy- *R. solanacearum*. A questo scopo sono stati disegnati ed utilizzati due differenti chip, uno sintetizzato con EST di pomodoro selezionate a partire da una collezione di EST differenzialmente espresse in una cultivar di pomodoro resistente a *Ralstonia solanacearum*, e l'altro costruito a partire da una collezione di oltre 20.000 EST di patata.

- Dal primo esperimento è stato identificato un numero ridotto di EST differenzialmente espresse.
- La verifica con l'analisi RT-qPCR di alcuni EST potenzialmente coinvolti nella interazione patata- patogeno non ha dato generalmente risultati positivi, probabilmente per il ridotto livello di omologia tra i trascritti di patata e le sequenze EST di pomodoro su cui sono state disegnate le coppie di primer.
- Dal secondo esperimento sono stati identificati 256 differenzialmente espressi nel confronto tra radici e foglie, inoculate e non, di *S. commersonii* a 6 giorni dall'inoculazione.
- Gran parte dei geni differenzialmente espressi sono risultati coinvolti nella risposta a vari tipi di stress e nel processo di segnalazione dell'acido abscissico, come ad esempio i geni codificanti per: il recettore dell'etilene, la proteina SAG101, l'enzima oxophytodienoate reductasi, una proteina della famiglia mate efflux ed una proteina appartenente alla famiglia wd-40. In aggiunta è stata identificata una chinasi associata al recettore

interleuchina 1, per la quale recentemente è stato descritto un ruolo nella percezione delle MAMPs

- L'espressione differenziale di questi geni è stata confermata nella maggior parte dei casi con l'analisi RT-qPCR, in cui il profilo di espressione è risultato generalmente opposto nelle radici del genotipo suscettibile rispetto a quello resistente alle 72 ore dall'inoculazione.
- L'espressione di questi geni a 72 ore dall'inoculazione (differentemente da quanto accade in *S. tuberosum*) è più simile a quella osservata in entrambi i genotipi negli stadi più avanzati dell'infezione. Ciò lascia ipotizzare che la resistenza orizzontale mostrata dal genotipo resistente *S. commersonii* possa essere legata ad una percezione più rapida del patogeno rispetto a quella del genotipo suscettibile *S. tuberosum*, come già indicato in letteratura avvenire per altri patosistemi.

Il presente studio quindi fornisce un eccellente strumento per accrescere le nostre conoscenze circa l'interazione patata-*Ralstonia* e per identificare geni candidati per i quali successivi studi di genomica funzionale potranno confermare il loro ruolo nella risposta della pianta a questo patogeno.

Per lo studio del patosistema *A. fabae*-fava è stata realizzata la fase preliminare di un lavoro di miglioramento genetico avanzato, finalizzato ad individuare marcatori associati a QTL di resistenza ad *A. fabae*, da poter utilizzare in futuri progetti di MAS. A tale scopo sono state saturate mappe genetiche preesistenti di tre differenti popolazioni RIL F₆ (*Vf6 x Vf136*, *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf27*) di *V. faba* in cui uno dei parentali mostrava un differente livello di resistenza nei confronti del patogeno *A. fabae*. In particolare:

- Sono stati trasferiti 40 marcatori polimorfici tra SSR (precedentemente sviluppati nella specie modello *P. sativum* ed in altre cultivar di *V. faba*), e marcatori derivati da EST (di *M. truncatula* ed altre specie di leguminose). Di questi, 18 (tutti derivati da EST) sono stati analizzati nella popolazione *Vf6 x Vf136*, 18 (15 derivati da EST e 3 SSR) nella popolazione *Vf29H x Vf136* e 4 (tutti SSR) nella popolazione *Vf6 x Vf27*.

- La localizzazione cromosomica dei marcatori molecolari sviluppati in questo lavoro e di altri sviluppati in lavori precedenti ha permesso di ottenere nuove mappe genetiche per le tre popolazioni. In particolare è stato possibile assegnare 21, 25 e 16 gruppi di linkage a cromosomi specifici nelle mappe delle popolazioni *Vf6 x Vf136*, *Vf29H x Vf136* e *Vf6 x Vf27*, rispettivamente, ed aumentarne il grado di risoluzione di ciascuna mappa. (3096,3 cM, 1652,2 cM e 1875,1 cM, rispettivamente).
- Nelle nuove mappe così ottenute si è comparata la localizzazione cromosomica dei 12 marcatori risultati polimorfici in tutte e tre le popolazioni, risultando associati sugli stessi cromosomi. Questo dato conferma l'affidabilità nell'utilizzo di marcatori molecolari costruiti su regioni genomiche altamente conservate in diverse specie.
- Nella nuova mappa della popolazione *Vf6 x Vf136*, grazie all'aggiunta di un cospicuo numero di marcatori, è stata riconfermata e ridefinita la posizione di 4 QTL associati alla resistenza ad *A. fabae*, localizzati rispettivamente nei cromosomi II.a e III.a, che nella maggior parte dei casi spiegavano la gran parte della variabilità fenotipica osservata.

Il trasferimento di informazioni tra diverse specie di interesse agronomico ha facilitato l'ulteriore saturazione di queste mappe genetiche nelle regioni ove sono presenti i QTL, grazie alla possibilità di sfruttare l'elevato livello di similitudine esistente tra queste specie. Tale lavoro di saturazione risulterà utile ad identificare potenziali geni candidati ed allo sviluppo di marcatori molecolari utili in programmi di miglioramento genetico assistito (MAS).

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha messo in evidenza come strumenti di genomica strutturale e funzionale possano essere di ausilio per lo studio di molti caratteri utili al miglioramento genetico delle specie oggetto di studio, tra i quali lo studio delle basi molecolari dei fenomeni di resistenza, che offre la possibilità di identificare geni e/o QTL per il controllo della resistenza, e successivamente di trasferirli in varietà coltivate suscettibili. In particolare, è servito ad approfondire le conoscenze delle basi genetiche e dei meccanismi molecolari associati alla resistenza di *V. faba* e *S. commersonii* rispettivamente ai fitopatogeni *A. fabae* e *R. solanacearum*.

5 Bibliografía

Akiyama T, Gohda J, Shibata S, Nomura Y, Azuma S, Ohmori Y, Sugano S, Arai H, Yamamoto T, Inoue J. (2001). Mammalian homologue of E. coli Ras-like GTPase (ERA) is a possible apoptosis regulator with RNA binding activity. *Genes Cells*. 11:987-1001.

Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J* 19: 2304–2314.

Ane JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Levy J, Debelle F, Baek JM, Kaló P, Rosenberg C, Roe S, Long R, Dénarié J, Cook DR. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303:1364-1367.

Arbaoui M, Link W, Satovic Z, Torres AM. (2008). Quantitative trait loci of frost tolerance and physiologically related traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Euphytica*. 164:93-104. DOI: 10.1007/s10681-008-9654-0.

Aspiras RB, Cruz AR. (1985). Potential biological control of bacteria wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985 (redatto da Persley G.J.). Australian Centre of International Agricultural Research proceeding 13: 89-92.

Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet M, Petit A, Rameau C, Lejeune-Henaut I, Huguet T, Burstin J. (2006). Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet*. 112(6):1024-1041.

Autrique A, Potts MJ. (1987). The influence of mixed cropping on the control of bacterial blight wilt (*Pseudomonas solanacearum*). *Annals of Applied Biology* 111:125-133.

Avila CM, Satovic Z, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT, TorresAM. (2004). Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1071–1078.

Ávila CM, Sillero JC., Moreno MT, Torres AM. (2003). Identification of RADP markers linked to the *Uvf-1* gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. *Theor Appl Genet*. 107:353-358.

Ávila CM; Satovic Z; Sillero JC; Rubiales D; Moreno MT., Torres AM. (2004). Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in

bacterial blight wilt (*Pseudomonas solanacearum*). *Annals of Applied Biology* 111:125-133.

Baldwin D, Crane V, Rice D. (1999). A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2:96-103.

Bang WY, Kim SW, Jeong IS, Koiwa H, Bahk JD.(2008). The C-terminal region of Arabidopsis CPL1 interacts with the abiotic stress- and ABA-responsive transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 8;372(4):907-12. Epub 2008 Jun 9. (640-967)

Baulcombe DC .(1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 2:109-113.

Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL. (2004). Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 391-399.

Bennet MD, Smith JB. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Physiological Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences* 274: 227- 274.

Bennetzen JL. (2000). Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: Microcolinearity and its many exceptions. *Plant Cell*. 12(7):1021- 1030.

Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A. (2002).Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection, *Plant Physiol.*, vol. 128, pp. 951–961.

Bolle C. (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692.

Bond DA, Jellis GJ, Rowland GG, Le Guen J, Robertson LD, Khalil SA, Li-Juan L. (1994). Present status and future strategy in breeding faba beans (*Vicia faba* L.) for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73:151–166.

Bond DA, Pope M. (1980). *Ascochyta fabae* on winter beans (*Vicia faba*) pathogen spread and variation in host resistance. *Plant Pathology* 29: 59-65.

Bond DA, Poulsen MH. (1983). Pollination. *In: The Faba Bean*. Edited by: Hebblethwaite P. D. Butterworths. 77-101.

Boutin SR, Young ND, Olson T, Yu ZH, Shoemaker R, Vallejos C.(1995). Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genome* 38: 928-937.

Bradbury JF. (1986). Guide to plant pathogenic bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux International Mycological Institute.

Brauner S, Murphy RL, Walling JG, Przyborowski J, Weeden NF. (2002). STS markers for comparative mapping in legumes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127 (4):616-622.

Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson V.M. (1998). Characterization of *LeMir*, a Root-Knot nematode induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol.* 118: 237-247.

Brito B, Aldon D, Barberis P, Boucher C, Genin S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 109–119.

Brito B, Marena M, Barberis P, Boucher C, Genin S. (1999). *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 31: 237–251.

Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Bee S, Gepts P, Vanderleyden J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.): Model food legumes. *Plant Soil.* 252:55-128.

Brown CR, Mojtahedi H, Santo GS. (1999). Genetic analysis of resistance to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from *Solanum hougasii* in cultivated potato. *Journal of Nematology* 31: 264-271.

Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A. (1962). Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726

Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin S, Kolonay JF, Madupu R, et al. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10181–10186.

Cabrera A, Martín A. (1989a). Genetic mapping using trisomics in *Vicia faba* L. *FABIS Newslett.* 23:5-7.

Cabrera A., Martín A. (1989b). Analysis of genetic linkage in faba bean (*Vicia faba* L.). *FABIS Newslett.* 24:3-5.

Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, Penninckx IA, Anderson JP, Maclean DJ, Cammue BP, Ebert PR, Manners JM. (2003). Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133(3):1272-84.

Cannon SB, McCombi WR, Sato S, Tabata S, Denny R, Palmenr L, Katari M, Young ND, Stacey G. (2003). Evolution and microsinenty of the apyrase gene family in three legume genomes. *Mol Genet Genomics*. 270:347-361.

Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J, Wang X, Mudge J, Vasdewani J, Schiex T, Spannagl M, Monaghan E, Nicholson C, Humphray SJ, Schoof H, Mayer KFX, Rogers J, Quetier F, Oldroyd GE, Debelle F, Cook DR, Retzel EF, Roe BA, Town CD, Tabata S, Van de Peer Y, Young ND. (2006). Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(40):14959-14964.

Carmeille A, Prior P, Kodja H, Chiroleu, F, Luisetti J, and Besse P. (2006). Evaluation of Resistance to Race 3, Biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in Tomato Germplasm, *J. Phytopathol.*, vol. 154, pp. 398–402.

Carputo D, Barone A, Cardi T, Sebastiano A, Frusciante L, Peloquin SJ. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 94: 12013-12017.

Carré S, Tasei JN, Le Guen J, Mesquida J, Morin G. (1993). The genetic control of seven isozymic loci in *Vicia faba* L. Identification of lines and estimates of outcrossing rates between plants pollinated by bumble bees. *Ann. Appl. Biol.* 122:555-568.

Chen WY. (1984). Influence of the root-knot nematode on wilt resistance of flue-cured tobacco infested by *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin of the Tobacco Research Institute, Taiwan* 21, 44-48.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. (2006). Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.

Choi HK, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kaló P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR. (2004a). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *Medicago sativa*. *Genetics*. 166:1463-1502.

Choi HK, Luckow MA., Doyle J, Cook DR. (2006). Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol Genet Genomics*. 276(1):56-70.

Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND., and Cook DR. (2004b). Estimating genome

conservation between crop and model legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:15289-15294.

Chooi WY. (1971). Variation in nuclear DNA content in the genus *Vicia*. *Genetics.* 68:195-211.

Choumane W, Winter P, Weigand F, Kahl G.(2000). Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. *Theor Appl Genet* 101: 269-278.

Churchill GA, Doerge RW. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait loci affecting a quantitative character. *Genetics.* 138: 963-971.

Ciampi-Panno L, Fernandez C, Bustamante P, Andrade N, Ojeda S, Contreras A. (1989). Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 66: 315-332.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK .(2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142,169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5.

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, pp. 3674-3676.

Cornelis GR, Van Gijsegem F. (2000). Assembly and function of type III secretory system. *Annual Review of Microbiology* 54: 735-7742.

Cubero JI, Hernández L. (1991). Breeding faba bean (*Vicia faba* L.) for resistance to *Orobanche crenata* Forks. *Options Méditerranéennes* 10:51-57.

Cubero JI. (1974). On the evolution of *Vicia faba* L. *Theor Appl Genet.* 45:47-51.

Cubero JI. (1992). Variedades tradicionales de leguminosas de grano para alimentación humana. *In: Cultivos Marginados: otra perspectiva histórica.* Hernández Bermejo J. E. y León J. FAO (eds.): Roma, Italia. pp: 280-301.

Cunnac S, Boucher C, Genin S. (2004). Characterization of the cisacting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 186: 2309–2318.

Daly JM. (1984). The role of recognition in plant disease. *Annual Review of Phytopatology* 22: 273-307.

Danna CH, Millet YA, Koller T, Han SW, Bent AF, Ronald PC, Ausubel FM. (2011). The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of

Xanthomonas Ax21 secreted peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(22): 9286–9291.

Darvasi A, Soller M. (1997). A simple method to calculate resolving power and confidence interval of *QTL* map location. Behavior Genetics 27(2): 125–132.

Denny TP, Baek SR. (1991). Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 4: 198–206.

Denny TP. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 33: 173-197.

Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon, J, Arlat M, Marco Y. (1998). Genetic Characterization of RRS1, a Recessive Locus in *Arabidopsis thaliana* That Confers Resistance to the Bacterial Soilborne Pathogen *Ralstonia solanacearum*, Mol. Plant-Microbe Interact., vol. 11, pp. 659–667.

Devos KM, Gale MD. (2000). Genome relationships: The grass model in current research. Plant Cell. 12(5):637-646.

Díaz-Ruiz, R, Satovic, Z, Ávila CM, Alfaro CM, Gutierrez, C, Torres A.M. (2009). Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). Crop & Pasture Science 60: 353:361

Doyle JJ, Luckow MA. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiol 131:900–910.

Dwivedi S, Perotti E, Ortiz R. (2008). Towards molecular breeding of reproductive traits in cereal crops. Plant Biotechnology Journal 6: 529–559 DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00343.x

Dwivedi SL, Crouch JH, Mackill DJ, Xu Y, Blair MW, Ragot M, Upadhyaya HD, Ortiz R. (2007). The molecularization of public sector crop breeding: progress, problems, and prospects. Advances in Agronomy. 95: 163-318.

Echenique V, Schrauf G, Selva JP. (2004). Genómica. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA. Buenos Aires, Argentina. 212-228.

Eisen JA. (1998). Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res* , 8:163-167.

Ellwood S, Phan TT, Jordan M, Hane J, Torres AM, Avila C, Cruz-Izquierdo S, Oliver R. (2008). Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. BMC Genomics 9: 380.

Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Milhacea S, Kaló P, Kiss GB. (2002). A receptor *Kinase* gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 417:962-966.

Esposito N, Ovchinnikova OG, Barone A, Zoina A, Holst O, Evidente A. (2008) Host and non Host response to bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant-pathogen interaction. *Chemistry and Biodiversity* 5:2662-2675.

Farag NS, Fawzi FG, El-Said SIA, Mikhail MS. (1986). Streptomycin in relation to potato brown rot control. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21: 115-122.

Farag NS, Lashin SM, All-Abdel RS, Shatta HM, Seif-Elyazal AM. (1982). Antibiotics and control of potato black leg and brown rot disease. *Agricultural Research Review* 60: 149-166.

Fedorova M, van de Mortel J, Matsumoto PA, Cho J, Town CD, VandenBosh KA, Gantt JS, Vance CP. (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *medicago truncatula*. *Plant Physiol* 130: 519-37.

Feltus F A., Hart GE, Schertz KF, Casa AM, Kresovich S, Abraham S., Klein PE, Brown PJ, Paterson AH. (2006). Alignment of genetic maps and QTLs between inter- and intraspecific sorghum populations. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1295- 1305.

Feng, J, Yuan F, Gao Y, Liang C, Xu J, Zhang C., He L. (2003). A Novel Antimicrobial Protein Isolated from Potato (*Solanum tuberosum*) Shares Homology with an Acid Phosphatase, *Biochem. J.* vol. 376, pp. 481–487.

Flandez-Galvez H, Ford R, Pang ECK, Ades PK, Taylor PWJ .(2003). QTL analysis for ascochyta blight resistance in an intraspecific population of chickpea (*Cicer arietinum*). *Theoretical and Applied Genetics* 107, 1257–1265. doi: 10.1007/s00122-003-1371-4.

Flor HH. (1955). Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 55: 680-685.

Fode B, Siensen T, Thurow C, Weigel R, Gatz C. (2008). The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts with Class II TGA transcription factors and is essential for the activation of Stress-Inducible Promoters. *The Plant Cell* 20: 3122-3135.

French ER, Sequeira L. (1968). Bacterial wilt or moko of plantain in Peru. *Fitopatologia* 3: 27-38.

French ER. (1985). Multiple disease resistance in potato cultivars with *Solanum phureja* and *Solanum demissum* background. *Phytopathology* 75: 1288.

Fuchs J, Strehl S, Brandes A, Schweizer D, Schubert I. (1998). Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome—heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. *Chromosome Research* 6, 219–230.

Gale MD., Devos KM. (1998). Comparative genetics in the grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1971-1974.

Gallardo PB, Panno LC. (1989). Biological control of bacterial wilt of potato induced by *Pseudomonas solanacearum*. *Revista de Microbiologia* 20: 18-26.

Gaunt RE. (1983) Shoot diseases caused by fungal pathogens. En: *The Faba Bean* (ed.: P.D. Hebblethwaite), págs: 463-492. Butterworths, Londres.

Genin S, Boucher C. (2002). *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology* 3: 111–118.

Gepts P, William D, Beavis E, Brummer C, Randy C, Shoemaker, H. Thomas Stalker, Norman F. Weeden, and Nevin D. Young. (2005). Legumes as a Model Plant Family. Genomics for food and feed report of cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physio* 1137:1228-1235.

Gomez-Gomez L, Boller T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003–1011.

González ET, Allen C. (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 536–544.

Graham J, Jones DA, Lloyd AB. (1979b). Survival of *Pseudomonas solanacearum* in plant debris and in latency infected potato tubers. *Phytopathology* 69: 1100- 1103.

Graham J, Lloyd AB. (1979a). Survival of the potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research* 30: 489-496.

Granada GA, Sequeira L. (1983). Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 433-440.

Greenberg JT, Vinatzer BA. (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 20-28.

- Gutiérrez N, Ávila CM, Rodríguez-Suárez C, Moreno MT, Torres AM. (2007).** Development of SCAR markers linked to a gene controlling absence of tannins in faba bean. *Mol. Breeding*. 19:305-314.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. (1996).** Resistance gene dependent plant defence response. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hanneman Jr. RE. (1989).** The potato germplasm resource. *American Potato Journal* 66:655-667.
- Hanounik SB, Bisri M. (1991).** Status of diseases of faba bean in the Mediterranean region and their control. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires*, 10: 59-66.
- Hanounik SB, Robertson LD. (1989).** Resistance in *Vicia faba* germ plasm to blight caused by *Ascochyta fabae*. *Plant Dis* 73: 202-205.
- Hartman GL, Elphinstone JG. (1994).** Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 157-177.
- Hawkes JG. (1992).** Biosystems of the potato. In: *The potato crop 2nd edition* (redatto da Harris P.). Chapman Hall, London, UK: 13-64
- Hayward AC. (1994a).** The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 9-24.
- Heath MC. (1991).** The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81: 127-130.
- Heath MC. (1997).** Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. *G.C. Carroll and P. Tudzynski (Eds.) The Mycota Vol. V. Plant Relationships Part B, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg* pp.257-276.
- Hecht V, Foucher F, Ferrándiz C, Macknight R, Navarro C, Morin J, VardyME, Ellis N, Beltran JP, Rameau C, Weller JL. (2005).** Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiol*. 137:1420-1434.
- Hikichi Y, Yoshimochi T, Tsujimoto S, Shinohara R, Nakaho K, Kanda A, Kiba A, Ohnishi K. (2007).** Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum* *Plant Biotechnology* 24, 149–154.
- Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y. (2008).** Transcriptional Responses of *Arabidopsis thaliana* during Wilt Disease Caused by the Soil-Borne Phytopathogenic Bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 3(7): e2589.

Huang Q, Allen C. (1997). An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **179**: 7369–7378.

Hurkman H, William J, Peggy Tao H, Charlene K, Tanaka .(1991). Germin-Like Polypeptides Increase in Barley Roots during Salt Stress *Plant Physiol.* **97**, 366-374

Hutcheson SW. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:59–90.

Ilic K, San-Miguel PJ, Bennetzen JL. (2003). A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum and rice genomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**: 12265-12270.

Iruela M, Rubio J, Barro F, Cubero JI, Millán T, Gil J. (2006). Detection of two quantitative trait loci for resistance to ascochyta blight in an intra-specific cross of chickpea (*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated with resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 278–287. doi: 10.1007/s00122-005-0126-9.

Janse JD, van den Beld HE, Ephinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam Sin NNA, van Vaerenbergh J. (2004). Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology* **87**: 147-155.

Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW, Price HJ. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* **86**: 609-613.

Johnston SA, den Nfe TPM, Peloquin SJ, Hanneman Jr. RE.(1980). The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics* **57**:5-9.

Johnston SA, Hanneman Jr. RE. (1982). Manipulations of Endosperm Balance Number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science* **217**:446-448.

Kaiser WJ .(1997). Inter- and intranational spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: 215-224.

Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis TH, Kiss GB. (2004). Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol. Genet. Genomics.* **272**:235–246.

Kelman A. (1953). The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station N° 99: 194.

Kharrat M, Onfroy C, Tivoli B, Halila H .(1997). Caractérisation morphologique et biologique des souches tunisiennes d'*Ascochyta fabae*, responsable de l'antracnose des fèves. Les légumineuses alimentaires méditerranéennes. Rennes (France), 20-22 février. Ed. INRA, Paris (France).

Kidd BN, Edgar CI, Kumar KK, Aitken EA, Schenk PM, Manners JM, Kazan K. (2009). The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in Arabidopsis. *Plant Cell*. 21(8):2237-52.

Ko K, Orfanides AG, Straus NA. (1987). A model for the evolution of the *Vicia faba* chloroplast genome. *Theor Appl Genet*. 74:125-139.

Kohpina S, Knight R, Stoddard FL. (1999). Variability of *Ascochyta fabae* in South Australia. *Aust J Agric Res* 50: 1475-1481.

Kosambi DD.(1994). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-493.

Kumagai MH, Keller Y, Bouvier F, Clary D, Camara B. (1998). Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 14:305-315.

La Ferriere LT, Helgeson JP, Allen C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum* x *Solanum commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1272-1278.

Ladizinsky G. (1975). Seed protein electrophoresis of the wild and cultivated species of selection faba of *Vicia*. *Euphytica*. 24:785-788.

Lagercrantz U, Lydiate DJ. (1996). Comparative genome mapping in Brassica. *Genetics*. 144:1903-1910.

Lambert KN, Ferrie BJ, Nombela G, Brenner ED, Williamson V.M. (1999). Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 55: 341-348.

Lassner MW, Peterson P, Yoder JI. (1989). Simultaneous amplification of multiple DNA fragments by polymerase chain reaction in the analysis of transgenic plants and their progeny. *Plant Mol Biol Rep* 7: 116-128.

Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowski MF. (2005). Evolutionary rates analysis of *Leguminosae* implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*. 54:575–594.

Lawes DA, Bond DA y Poulsen MH. (1983). Classification, origin, breeding methods and objectives. In: P.D. Hebblethwaite (Ed.), *The Faba Bean (Vicia faba L.)*. A basis for improvement, pp. 23-67, Butterworths, London, UK.

Lee JM, Grant D, Vallejos CE, Shoemaker RC. (2001). Genome organization in dicots. II. *Arabidopsis* as a bridging species to resolve genome duplication events among legumes. *Theor Appl Genet.* 103:765-773.

Lelliott RA, Stead DE. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology*, Blackwell Scientific Press, London (UK) Vol 2:216.

Lemieux B, Aharoni A, Schena M. (1998). Overview of DNA chip technology. *Mol. Breed.* 4, 277–289.

Levy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ane JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F. (2004). A putative Ca⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303:1361-1364.

Lewis G, Schrire B, MacKinder B, Lock M. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanic Garden. Kew, UK.

Lichtenzweig J, Bonfil D, Zhang HB, Shtienberg D, Abbo S. (2006). Mapping quantitative trait loci in chickpea associated with time to flower and resistance to *Didymella rabiei* the causal agent of Ascochyta blight. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 1357–1369. doi: 10.1007/s00122-006-0390-3.

Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Hénaut I, Burstin J.(2005). Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.) *Theor Appl Genet.* 6:1022–31.

Louwes KM, Hoekstra R, Matthew WM. (1992). Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *Solanum Circaeifolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. 2. Sexual hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 84:363-370.

Mancini R., De Pace C, Scarascia GT, Delre V, Vittori D. (1989). Isozyme gene markers in *Vicia faba* L. *Theor Appl Genet* 77:657-667.

Marteinssen RA.(1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2021-2026.

Matta A. (1996). *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore: 230-252.

- Maurin N, Tivoli B. (1992).** Variation in the resistance of *Vicia faba* to *Ascochyta fabae* in relation to disease development in field trials. *Plant Pathol* 41:737–744.
- McGarvey JA, Denny TP, Schell MA. (1999).** Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology* 89, 1233-1239.
- Menancio-Hautea D, Fatokum CA, Kumar L, Danesh D, Young ND.(1993).** Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and Cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walpers) using RFLPs mapping data. *Theor Appl Genet.* 86:797-810.
- Milling A, Babujee L, Allen C. (2011).** *Ralstonia solanacearum* Extracellular Polysaccharide Is a Specific Elicitor of Defense Responses in Wilt-Resistant Tomato Plants. *PLoS ONE* 6(1): e15853. doi:10.1371/journal.pone.0015853
Mol Breeding, 4:277-289.
- Mudge J, Cannon S, Kalo P, Oldroyd G, Roe B, Town C, Young N. (2005).** Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 5(1):15.
- Murakoshi S, Takahashi M. (1984).** Trials of some control of tomato wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* 31: 50-56.
- Murashige T, Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nelson M, Phan HTT, Ellwood SR, Moolhuijzen P, Hane J, Williams A, O'Lone C, Fosu-Nyarko J, Scobie M, Cakir M, Jones M, Bellgard M, Ksiazkiewicz M, Wolko B, Barker S, Oliver R, Cowling W. (2006).** The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.- location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet.* 113(2):225-238.
- Nguyen TT, Taylor PWJ, Brouwer JB, Pang ECK, Ford R .(2001).** A novel source of resistance in lentil (*Lens culinaris* spp. *culinaris*) to ascochyta blight caused by *Ascochyta lentis*. *Australasian Plant Pathology* 30, 211–215. doi: 10.1071/AP01021.
- Nicolas C, Rodriguez D, Poulsen F, Eriksen EN, Nicolas G. (1997).** The Expression of an Abscisic Acid-Responsive Glycine-Rich Protein Coincides with the Level of Seed Dormancy in *Fagus sylvatica*. *Plant Cell Physiol.* 38(12): 1303-1310.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF, Dangl JL. (2003).** Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 35: 579-609.

Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.

Ondrej M .(1993). Response of resistant lines of horse bean to pathogenous fungus *Ascochyta fabae* Speg. *Plant Genetic Resources, Annual Report* 2: 45-48

Orgambide G, Montrozier H, Servin P, Roussel J, Trigalet-Demery D, Trigalet A. (1991). High heterogeneity of the exopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 266: 8312-8321.

Ortiz R, Franco J, Iwanaga M. (1997). Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica* 96:339-344.

Pavek JJ, Corsini DL. (2001). Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research* 78: 433-441.

Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M y Rafalski A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15 (10): 1275-1287.

Peat WE, Adham JY. (1984). The use of isozyme genes as markers in the population genetics of *Vicia faba* L. *In: Systems for cytogenetic analysis in Vicia faba* L. *Advances in Agricultural Biotechnology.* 2:109-117.

Persley GJ. (1986a). Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. *Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985.* Australian Centre of International Agricultural Research proceeding 13: 145.

Phan HTT, Ellwood SR, Adhikari K, Nelson MN, Oliver RP. (2007a). The first genetic and comparative map of white lupin (*Lupinus albus* L.): Identification of QTLs for anthracnose resistance and flowering time, and a locus for alkaloid content. *DNA Re*, 14(2):59-70.

Phan HTT, Ellwood SR, Ford R, Thomas S, Oliver RP. (2006). Differences in syntenic complexity between *Medicago truncatula* with *Lens culinaris* and *Lupinus albus*. *Funct. Plant Biol.* 33(8):775-782.

Phan HTT, Ellwood SR, Hane JK, Ford R, Materne M, Oliver RP. (2007b). Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *culinaris*. *Theor Appl Genet.* 114(3):549-558.

Pianzola MJ, Zarantonelli L, González G, Franco Fraguas L, Vazquez A. (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 67-78.

Polignano GB, Sonante G. (1992). Characterization of faba-bean populations by isoenzyme patterns of GOT and PGI. *FABIS Newslett* 31:12-16.

Pozarkova D, Koblizkova A, Roman B, Torres AM, Lucretti S, Lysak M, Dolezel J, Macas J. (2002). Development and characterization of microsatellite markers from chromosome 1-specific DNA libraries of *Vicia faba*. *Biologia Plantarum*. 45:337-345.

Pradhanang PM, Elphinstone JG, Fox RTV. (2000). Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology* 49: 403-413.

Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, Retana SG, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. (2009). Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs *Potato virus X* Movement. *The Plant Cell* 21: 15411-1555.

Raina SN, Ogihara Y. (1995). Chloroplast DNA diversity in *Vicia faba* and its close wild relatives: implications for reassessment. *Theor Appl Genet*. 88:261-266.

Ramsay G, van de Ven W, Waugh R, Griffiths DW, Powel W. (1995). Mapping quantitative trait loci in faba beans. *In: AEP (ed.) 2nd Eur Conf*

Rashid KY, Bernier CC, Conner RL. (1991a). Genetic of resistance in faba bean inbred lines to five isolates of *Ascochyta fabae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13: 218-225.

Rashid KY, Bernier CC, Conner RL. (1991b). Evaluation of faba bean for resistance to *Ascochyta fabae* and development of host differential for race identification. *Plant Dis* 75: 852-855

Rees H, Narayan RKJ. (1989). Biological implications of genome evolution. *In: Advances in Legume Biology*. Stirton CH & Zarucchi JL (eds.). *Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* pp 533-544.

Roberts DP, Denny TP, Schell MA. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *Journal*

Rodrigues-Neto J, Malavolta VA, Hamahiga I. (1984). Atypical symptoms in potato tubers infected with *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith. *Biologico* 50: 93-95.

Román B, Satovic Z, Avila CM, Rubiales D, Moreno MT, TorresAM. (2003). Locating genes associated with *Ascochyta fabae* resistance in *Vicia faba* L. *Australian Journal of Agricultural Research* 54, 85–90. doi: 10.1071/AR02034.

Román B., Satovic Z., Pozarkova D., Macas J., Dolezel J., Cubero J. I., and Torres A. M. 2004. Development of a composite map in *vicia faba*, breeding applications and future prospects. *Theor Appl Genet.* 108:1079-1088.

Román B., Tórres A., Rubiales D., Cubero J. I., and Satovic Z. 2002. Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome.* 45:1057-1063.

Rubeena , Taylor PWJ, Ades PK, Ford R. (2006). QTL mapping of resistance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*). *Plant Breeding* 125, 506–512. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01259.x

Saddler GS. (1994). *Burkholderia solanacearum*. IMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 1220, Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378.

Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billaut A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 45: 497-502.

Salvi S, Tuberosa R. (2005). To clone or not clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, 10: 297-304.

Sanseverino W, Roma G, De Simone M, Faino L, Melito S., Stupka E, Frusciante L, Ercolano M R. (2009). PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Res.* 38. 814–821.

Santra DK, Tekeoglu M, Ratnaparkhe M, Kaiser WJ, Muehlbauer FJ. (2000). Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. *Crop Science* 40, 1606–1612.

Satovic Z., Torres A. M., and Cubero J. I. 1996. Genetic mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. *Theor Appl Genet.* 93:1130-1138.

Schell MA, Roberts DP, Denny TP. (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* 70: 4501–4508.

Schell MA. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* 38: 263-292.

Schubert I, Oud J.L. (1997). There is an upper limit of chromosome size for normal development of an organism. *Cell* 88, 515–520.

Seal SE, Elphinstone JG. (1994). Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da by Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 35-57. European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO) (2004). *Bulletin* 34: 173-178.

Seal SE, Jackson LA., Young JPW, Daniels MJ. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing; construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139: 1578-1594.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410–417.

Sillero JC, Avila CM., Moreno MT, Rubiales D.(2001). Identification of resistance to *Ascochyta fabae* in *Vicia faba* germplasm. *Plant Breed* 120:529–531.

Sirks H.J. (1931). Beitrage zur einer genotispichen Analyse der Ackerbohne, *Vicia faba* L. *Genetica*. 13:209-631.

Sitaramaiah K, Sinha SK. (1984). Interaction between *Meloidogyne javanica* and *Pseudomonas solanacearum* on brinjal. *Indian Journal of Nematology* 14: 1-5.

Sjödin J. (1971a). Induced translocation in *Vicia faba* L. *Hereditas*. 68:1-34.

Sjödin J.(1971b). Induced morphological variation in *Vicia faba* L. *Hereditas*. 67:155-180.

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kanebo T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M. (2002). A plant receptor kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*. 27:959-962.

Stracke S, Sato S, Sandal N, Koyama M, Kaneko T, Tabata S, Parniske M. (2004). Exploitation of colinear relationships between the genomes of *Lotus*

japonicus, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*, for positional cloning of a legume symbiosis gene. *Theor Appl Genet.* 108(3):442-449.

Strider DL, Jones RK, Haygood RA. (1981). Southern bacterial wilt of geranium caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 65: 52-53.

Suso MJ, Moreno MT, Cubero JI. (1993). New isozyme markers in *Vicia faba*: inheritance and linkage. *Plant Breed.* 111:170-172.

Suso MJ, Moreno MT. (1982). Genetic control of electrophoretic variation for glutamate oxalacetate transaminase(*GOT*) in *Vicia faba* L. *FEBIS Newalett* 5:14.

Suso MJ, Moreno MT., and Cubero JI. (1986). Inheritance of leaf characters in *Vicia faba*. II. Primitive cultivars. *Genet. Agr.* 40: 47-56.

Tans-Kersten J, Guan Y, Allen C. (1998). *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4918–4923.

Tar'an B, Warkentin T, Somers DJ, Miranda D, Vandenburg A. (2003). Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107, 1482–1491. doi: 10.1007/s00122-003-1379-9

Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anais G, Mangin B, Bazin B, Nazer R, Grimsley N. (1996). Polygenic Resistance of Tomato Plants to Bacterial Wilt in the French West Indies, *Mol. Plant–Microbe Interact.* vol. 9, pp. 837–842.

Timmerman-Vaughan GM, Frew TJ, Butler R, Murray S, Gilpin M, Falloon K, Johnston P, Lakeman MB, Russell A, Khan T.(2004). Validation of quantitative trait loci for *Ascochyta* blight resistance in pea (*Pisum sativum* L.) using populations from two crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1620–1631. doi: 10.1007/s00122-004-1779-5

Tingey WM, Mackenzie JD, Gregory P. (1978). Total foliar glycoalkaloids and resistance of wild potato species to *Empoasca fabae*. *American Potato Journal* 55: 57-585.

Tingey WM. (1984). Glycoalkaloids as pest resistance factors. *American Potato Journal* 67: 461-466.

Tivoli B, Reynaud B, Maurin N, Berthelem P, Le Guen J.(1987). Comparison of some methods for evaluation of reaction of different faba bean genotypes to *Ascochyta fabae*. *FABIS Newslett* 17:35–38.

Torres A.M, Millán T, Cabrera A, Cubero JI. (1993b). Establecimiento de nuevos grupos de ligamiento en *Vicia faba*. XXXVIII Jornadas Luso- Espanholas de Genética. Universidad do Algarve. Faro, Portugal. p. 169.

Torres AM, Satovic Z, Canovas J, Cobos S, Cubero JI. (1995). Genetics and mapping of a new isozyme loci in *Vicia faba* L. using trisomics. Theor. Appl. Genet. 91:783-789.

Torres AM, Vaz Patto MC, Satovic Z, and Cubero JI. (1998). New isozyme loci in faba bean (*Vicia faba* L.): genetic analysis and mapping using trisomics. J. Hered. 89:271-274.

Torres AM, Weeden NF, Martín A. (1993a). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theor Appl Genet. 85:937-945.

Turner JG, Ellis JC, Devoto A. (2002). The Jasmonate Signal Pathway The Plant Cell, S153–S164, Supplement 2002, www.plantcell.org © 2002 American Society of Plant Biologists

Turrà D, Lorito M. (2011). Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. Curr Protein Pept Sci. 2011 Aug 1;12(5):374-85.

Van de Ven M, Powell W, Ramsay G, Waugh R. (1990). Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in *Vicia*. Heredity 65: 329-342.

Van de Ven WTG, Waugh R, Duncan N, Ramsay G, Dow N, Powel W. (1991). Development of a genetic linkage map in *Vicia faba* using molecular and biochemical techniques. Aspects Appl. Biol. 27:49-54.

Van Den Ven WTG, Duncan N, Ramsay G, Phillips M, Powell W, Waugh R. (1993). Taxonomic relationships between *V. faba* and its relatives based on nuclear and mitochondrial RFLPs and PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 86, 71–80.

Van der Wolf J, Bonants P, Smith J, Hagenaar M., Nijhuis E, van Beckhoven J, Saddler G. (1998). Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe Determined by AFLP, RCPFGE, and RepPCR, Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects, Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J., Eds., Berlin: Springer-Verlag, INRA, , pp. 44–49.

Van Gijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, Barberis P, German S, Castello P, Boucher C. (1995). The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum* which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology* 15: 1095-1114.

Van Ooijen JW. (2004). *MapQTL[®] 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations.* Wageningen: Kyazma BV.

Van Ooijen JW.(2006). JoinMap Version 4.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Kyazma B.V., Wageningen, the Netherlands.

Vaz Patto MC, Torres AM, Koblizkova A, Macas J, and Cubero JI. 1999. Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F2 populations derived from trisomic plants. Theor Appl Genet 98: 736-743.

Vaz Patto MC. (1997). Desarrollo del mapa genético y localización de genes de interés agronómico en *Vicia faba* L. Master of Science of the Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ). 204 pp.

Vazquez A, Gonzalez G, Ferreira F, Moyna P, Kenne L. (1997). Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun ex Poim. Euphytica 95: 195-201.

Vijayakumar S, Thyagaraj NE, Vishwanathappa KR, Devaiah CP. (1985). Effect of type of planting material on yield and wilt incidence in potato. Bacterial Wilt Newsletter 3: 13-14.

Volcani Z, Palti J. (1960). *Pseudomonas solanacearum* in Israel. Plant Disease Reporter 44: 448-449.

Watanabe K, El-Nashaar HM, Iwanaga M. (1992). Transmission of bacterial wilt resistance by First Division Restitution (FDR) 2n pollen via 4x X 2x crosses in potatoes. Euphytica 60:21-26.

Weeden NF, Muehlbauer FJ, Ladizinsky G. (1992). Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. J. Hered. 83:123-129.

Wenneker M, Verdel MSW, Van Beuningen AR, Derk JHJ, Janse JD. (1999). *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). European Journal of Plant Pathology 105: 307-315.

Williams JS. Cooper RM. (2003). Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 63 (1), pp. 3-16.

Wojciechowski MF, Lavin M, Sanderson MJ. (2004). A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany. 91:1846–1862.

Wu YQ, Huang Y. (2007). An SSR genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and its comparison to published genetic map. Genome 50, 84–89.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M.(1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 36, 1251-1275.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39, 897-904.

Yamamoto K, Plitmann U. (1980). Isozyme polymorphism in species of the genus *Vicia* (*Leguminosae*) Japan J. Genetics. 55:151-164.

Yamamoto K. (1975). Estimation of genetic homogeneity by isozymes from interspecific hybrids of *Vicia*. I. Amylase isozyme patterns in the hybrid progenies between *Vicia amphicarpa* and *V. macrocarpa*. Japan J. Breed. 25:60-64.

Yamamoto K. (1979). Estimation of genetic homogeneity by isozymes from interspecific hybrids of *Vicia*. II. Amylase isozyme patterns in the hybrid progenies between *Vicia amphicarpa* and *V. macrocarpa*. Japan J. Breed.29:59-65.

Yan HH, Mudge J, Kim D-J, Shoemaker RC, Cook DR., Young ND.(2003). Estimates of conserved microsynteny among the genomes of *Glycine max*, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. Theor. Appl.Genet. 106:1256-1265.

Ye G, McNeill DL, Hill GD .(2003). Inheritance of foliar resistance to *Ascochyta* blight in lentil (*Lens culinaris*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 31, 77–83.

Zachos DG. (1957). The brown rot of potatoes in Greece. Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki, New Series 1: 115-117.

Zehr EI. (1969). Studies of the distribution and economic importance of *Pseudomonas solanacearum* in certain crops in the Philippines. Philippine Agriculturist 53:218-223.

Zeid M, Mitchell S, Link W, Carter M, Nawar A, Fulton T, Kresovich S.(2009). Simple sequence repeats (SSRs) in faba bean: new loci from Orobanche-resistant cultivar 'Giza 402'. Plant Breeding 128: 149–155.

Zhu H, Choi H, Cook DR., Shoemaker RC. (2005). Bridging model and crop legumes through comparative genomics. Plant Physiology. 137:1189-1196.

Zhu H, Kim DJ, Baek JM, Choi HK, Ellis LC, Kuester H, McCombie WR, Peng HM, Cook DR. (2003). Syntenic relationships between *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* reveal extensive divergence of genome organization. *Plant Physiology*. 131(3):1018-1026.

Zohary D, Hopf M. (1973). Domestication of pulses in the old world. *Science* **182**, 887–894.

6. APPENDICE

Appendice 1. Geni risultati differenzialmente espressi utilizzando il chip di pomodoro tre giorni dopo l'inoculazione. Sono classificati in base al tipo di confronto effettuato. AN, numero di accessione (TomatEST database).

AN	CONFRONTO	FOLD CHANGE	ANNOTAZIONE
DV104758	1	0,61	Hypothetical protein
DV104856	1	0,70	Hypothetical protein
BW685654	1	0,63	NA
DV104900	1	0,71	Hypothetical protein
DV104861	1	0,71	Hypothetical protein
BW686020	1	0,69	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
BI929403	1	0,72	Putative AT-hook DNA-binding protein
DV104602	1	0,68	DEAD-Box RNA helicase-like protein
CK715405	1	0,73	NA
DV104735	1	0,69	NA
DV104564	1	0,72	NA
BI204848	1	0,71	NA
DV104409	1	0,69	Nt1 protein
DV104663	1	0,69	Hypothetical protein MAA21_90
DV104335	1	0,72	NA
DV104519	1	0,74	Hypothetical protein
DV104820	1	0,73	Cellulose synthase (Fragment)
DV104539	1	0,74	Putative thioredoxin m2
DV104763	1	0,74	Putative spermine synthase
DV105073	1	0,75	Hypothetical protein
DB687849	1	0,77	Poly(A)-binding protein II-like
DV105077	1	0,77	Wound-induced protein 1
DV104605	1	0,78	GDP-mannose 3,5-epimerase
DV104972	1	0,79	Hypothetical protein
DV104725	1	0,79	NA
DV104319	1	0,79	40S ribosomal protein S6-2
AI897842	1	0,77	Putative kinase
DV105075	1	0,79	Hexose transporter
DV105041	1	0,75	NA
DV104400	1	0,76	Hypothetical protein
BF097843	1	0,75	NA
DV104359	1	0,78	Eukaryotic initiation factor 4A-2 (eIF4A-2) (eIF-4A-2)
DV104650	1	0,78	Q8H6S5_PONTR:CTV.2
DV104502	1	0,79	60S ribosomal protein
DV105032	1	0,77	NA
DV104469	1	0,78	Miraculin homologue

DV104966	1	0,77	Hypothetical protein
DV104780	1	0,80	Hypothetical protein (Fragment)
EG553278	1	0,80	NA
DV105051	3	2,64	Putative receptor-like protein kinase
DV104758	3	0,58	Hypothetical protein
DV104735	3	0,57	NA
AI898577	3	0,59	NA
DV104409	3	0,59	Nt1 protein
DV104900	3	0,62	Hypothetical protein
BI929403	3	0,62	Putative AT-hook DNA-binding protein
DV104652	3	0,63	Prephenate dehydratase
DV104602	3	0,60	DEAD-Box RNA helicase-like protein
BW685654	3	0,61	NA
DV104400	3	0,62	Hypothetical protein
DV104861	3	0,61	Hypothetical protein
DV105032	3	0,64	NA
BI423108	3	0,64	NA
DV104763	3	0,64	Putative spermine synthase
DV104564	3	0,61	NA
BW686020	3	0,62	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
DV105041	3	0,65	NA
DV104599	3	0,66	Two-pore calcium channel
DV104820	3	0,63	Cellulose synthase
DV104663	3	0,64	Hypothetical protein
DV104856	3	0,63	Hypothetical protein
BI204848	3	0,63	NA
DB687849	3	0,67	Poly(A)-binding protein II-like
CK574996	3	0,68	Endochitinase 3 precursor
DV105043	3	0,66	Cellulose synthase catalytic subunit
DV104765	3	0,65	Hypothetical protein
DV104940	3	0,68	Hypothetical protein
DV104698	3	0,67	CaMB-channel protein
DV104335	3	0,67	NA
DV104968	3	0,65	Proteophosphoglycan ppg4
BW687312	3	0,68	Ubiquitin-like protein
BF097843	3	0,68	NA
DV105015	3	0,66	Hypothetical protein
DV104746	3	0,66	NA
DV104519	3	0,69	Putative thioredoxin m2
DV104780	3	0,66	Hypothetical protein
DV104681	3	0,67	Electron transfer flavoprotein beta-subunit-like
DB719594	3	0,66	Regulator of gene silencing

DV104432	3	0,69	NA
DV104359	3	0,70	Eukaryotic initiation factor 4A-2 (eIF4A-2) (eIF-4A-2)
EG553077	3	0,69	Putative developmental protein
DV105073	3	0,68	Hypothetical protein
DV104972	3	0,68	Hypothetical protein
DV104484	3	0,67	Dehydroquinate dehydratase/shikimate:NADP oxidoreductase
DV104600	3	0,69	:ABA-responsive protein-like (At5g13200)
DV105077	3	0,68	Wound-induced protein 1
DV104332	3	0,71	Endo-1,4-beta-glucanase
DV104695	3	0,69	hsp like protein
DV104971	3	0,72	60S ribosomal protein L30, putative 78827-80170
CK715405	3	0,69	NA
DV104319	3	0,70	40S ribosomal protein S6-2
AW932926	3	0,70	NA
DB682882	3	0,67	NA
DV104650	3	0,69	NA
DV104866	3	0,70	Hypothetical protein
DV104638	3	0,71	60S ribosomal protein L31
BE432914	3	0,71	Spliceosomal protein
AI897842	3	0,69	Putative kinase
DV104770	3	0,73	Cytochrome C reductase-processing peptidase subunit II, MPP subunit II, P53
DV104469	3	0,71	Miraculin homologue
BG129400	3	0,72	Hypothetical protein
DV105075	3	0,71	Hexose transporter
DV104539	3	0,71	Putative thioredoxin m2
DV104495	3	0,69	Hypothetical protein
DV104417	3	0,72	Q84JM5_IPONI:Angustifolia
BI203222	3	0,73	Sucrose synthase
DV104965	3	0,73	NA
DV104402	3	0,74	Miraculin homologue
DV104966	3	0,72	Hypothetical protein
DV104464	3	0,74	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit
DV104592	3	0,74	NA
DV104447	3	0,73	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplast precursor
BW684985	3	0,73	Hypothetical protein
DV104462	3	0,74	NA
AI897776	3	0,72	Pectinesterase-like protein
DV104647	3	0,74	NA
DV104375	3	0,75	RING-H2 finger protein
DV104545	3	0,72	Q9LJF4_ARATH:Emb CAB87904.1

DV104382	3	0,74	Q5EXM1_HORVU:Pg4
DV105064	3	0,76	Putative ribosomal-protein S6 kinase-like protein
AW931702	3	0,74	zinc finger protein
DV104387	3	0,73	Dihydroneopterin aldolase
DV104513	3	0,74	RNA helicase SDE3 (Silencing defective protein 3)
DV105036	3	0,76	Non-symbiotic hemoglobin class 1
DV104626	3	0,76	NA
DV104911	3	0,75	NA
EG553278	3	0,74	NA
BW686462	3	0,71	Hypothetical protein A
BE431474	3	0,77	NA
DV104790	3	0,74	Wound-induced basic protein
BW689272	3	0,74	NA
DV104633	3	0,77	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
DV104755	3	0,74	Hypothetical protein
BW685654	5	0,58	NA
DV104758	5	0,58	Hypothetical protein
DV104663	5	0,63	Hypothetical protein
DV104602	5	0,59	DEAD-Box RNA helicase-like protein
DV104409	5	0,60	Nt1 protein
DV104335	5	0,66	NA
DV104735	5	0,59	NA
BW686020	5	0,63	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
BI204848	5	0,63	NA
BF097843	5	0,69	NA
DV104432	5	0,70	NA
DV104856	5	0,63	Hypothetical protein
DV104519	5	0,70	Putative thioredoxin m2
BI929403	5	0,64	Putative AT-hook DNA-binding protein
DV104820	5	0,64	Cellulose synthase
DV105041	5	0,67	NA
DV104763	5	0,66	Putative spermine synthase
DV104968	5	0,66	Proteophosphoglycan ppg4
DV104861	5	0,64	Hypothetical protein
DV104900	5	0,65	Hypothetical protein
CK715405	5	0,68	NA
DV105073	5	0,68	Hypothetical protein
DV104600	5	0,71	ABA-responsive protein-like
DV104564	5	0,63	NA
DV105032	5	0,67	NA
DV104400	5	0,66	Hypothetical protein
DV104966	5	0,71	Hypothetical protein

DV104695	5	0,70	hsp like protein
DV104402	5	0,74	Miraculin homologue
DV104469	5	0,71	Miraculin homologue
DV105015	5	0,72	Hypothetical protein
DV104539	5	0,72	Putative thioredoxin m2
AI897842	5	0,70	:Putative kinase
DV104650	5	0,74	Q8H6S5_PONTR:CTV.2
DV105036	5	0,74	Non-symbiotic hemoglobin class 1
DV104359	5	0,72	Eukaryotic initiation factor 4A-2 (eIF4A-2) (eIF-4A-2)
BG129400	5	0,73	Hypothetical protein
BW684985	5	0,73	Hypothetical protein
DB687849	5	0,71	Poly(A)-binding protein II-like
DV105077	5	0,69	Wound-induced protein 1
BI423108	5	0,70	NA
DV104365	5	0,73	NA
DV104758	6	0,62	Hypothetical protein
BW685654	6	0,66	NA
DV104856	6	0,69	Hypothetical protein
DV104900	6	0,67	Hypothetical protein
DV104861	6	0,68	Hypothetical protein
BE431474	6	0,75	NA
BW686020	6	0,69	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
CK715405	6	0,74	NA
BI204848	6	0,71	NA
AI898577	6	0,67	NA
DV104602	6	0,68	DEAD-Box RNA helicase-like protein
DV104564	6	0,69	NA
BI929403	6	0,68	Putative AT-hook DNA-binding protein
BW687312	6	0,72	Ubiquitin-like protein
DV104735	6	0,66	NA
DB682882	6	0,68	NA
DV104972	6	0,74	Hypothetical protein
DV104663	6	0,71	Hypothetical protein
DV104387	6	0,73	Dihydroneopterin aldolase
DV104335	6	0,73	NA
DV104409	6	0,69	Nt1 protein
DV104484	6	0,69	Dehydroquinate dehydratase/shikimate:NADP oxidoreductase
BE432914	6	0,75	Spliceosomal protein
DV104519	6	0,73	Putative thioredoxin m2
DV104820	6	0,72	Cellulose synthase (Fragment)
DV105073	6	0,75	Hypothetical protein

DV105077	6	0,75	Wound-induced protein 1
DV104539	6	0,73	Putative thioredoxin m2
DB687849	6	0,73	Poly(A)-binding protein II-like
DV104763	6	0,71	Putative spermine synthase
DV104770	6	0,76	Cytochrome C reductase-processing peptidase subunit II, MPP subunit II, P53
DV104903	6	0,75	:Beta 1,3-glycosyltransferase-like protein II
DV104495	6	0,70	Hypothetical protein
DV104681	6	0,74	Electron transfer flavoprotein beta-subunit-like
DV104917	6	0,73	Q9LW90_TOBAC:DC1.2 homologue
DV104447	6	0,74	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplast precursor (IGPS)
DV104605	6	0,75	GDP-mannose 3,5-epimerase (GDP-Man 3,5-epimerase)
DV104332	6	0,76	Endo-1,4-beta-glucanase
DV104652	6	0,71	Prephenate dehydratase
DV104746	6	0,71	NA
DV104319	6	0,76	40S ribosomal protein S6-2
DV105075	6	0,77	Hexose transporter (Fragment)
AI897842	6	0,77	Putative kinase
BI421475	6	0,76	Hypothetical protein
EG553077	6	0,75	Putative developmental protein
DV104359	6	0,75	Eukaryotic initiation factor 4A-2 (eIF4A-2) (eIF-4A-2)
BW686462	6	0,71	Hypothetical protein At2g20920 (At2g20920/F5H14.11)
DV104760	6	0,81	Hypothetical protein At2g20920 (At2g20920/F5H14.11)
EG553278	6	0,80	NA
DB719594	6	0,75	Regulator of gene silencing
DV105062	6	0,81	Hypothetical protein
DV104650	6	0,73	Q8H6S5_PONTR:CTV.2
DV105041	6	0,73	NA
DV104400	6	0,72	Hypothetical protein
BF097843	6	0,73	NA
DV104780	6	0,71	Hypothetical protein
DV104469	6	0,78	Miraculin homologue (Fragment)
DV104966	6	0,78	Hypothetical protein

Appendice 2. Geni risultati differenzialmente espressi utilizzando il chip di pomodoro sei giorni dopo l'inoculo. Sono classificati in base al tipo di confronto effettuato. AN, numero di accessione (TomatEST database).

AN	CONFRONTO	FOLD CHANGE	ANNOTAZIONE
BW687974	1	1,65	Putative ribosomal protein S29
DV104343	1	2,14	Xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor protein
DV104386	1	1,88	26S proteasome regulatory 26S
DV104741	1	2,04	NA
BW687974	2	1,95	Putative ribosomal protein S29
DV104343	2	1,62	Xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor protein
DV104472	2	1,56	GTP binding / phospholipase activator/ protein binding
DV104647	2	2,80	NA
DV104743	2	2,07	diaminopimelate epimerase family protein
DV104974	2	1,32	NA
DV105064	2	2,13	protein serine kinase 1
DV104375	3	0,70	zinc finger RING finger family protein
DV104472	3	0,67	GTP binding / phospholipase activator/ protein binding
DV104592	3	0,52	NA
DV104741	3	0,70	NA

Appendice 3. Geni risultati differenzialmente espressi utilizzando il chip di patata. AN, numero di accessione (PotatEST ISOL@ database).

ID GENE	AN (SOLTU)	FOLD CHANGE	ANNOTAZIONE
id_11334	013773_1F_2	1,29	polypyrimidine tract binding
id_13281	016713_1F_4	1,34	P1B-ATPase heavy-metal transporter
id_14889	019082_1F_2	1,34	2 Hydroxy acid Glicolate short Chain
id_15047	019319_1C_3	1,21	NA
id_15283	019672_1F_5	1,3	wd-40 repeat family protein
id_16144	021061_1F_4	1,15	histone deacetylase
id_16627	023424_1F_4	1,25	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_17118	025062_1F_5	1,46	gs1-like protein
id_17956	026947_1F_7	1,27	DNA binding protein, putative [Ricinus communis]
id_18129	027198_3F_14	1,2	chorismate synthase
id_18773	028144_1F_3	1,87	SRO5
id_19983	029462_1C_3	1,09	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_20041	029536_1F_10	1,38	transitional endoplasmic reticulum
id_20245	029828_2F_3	1,22	endoribonuclease/protein kinase IRE1 [Arabidopsis thaliana]
id_20436	030073_1F_3	1,33	nbs-coding resistance gene analog
id_21039	031385_1C_3	1,36	NA
id_21646	032350_1F_2	1,36	pectinesterase family protein
id_22075	033204_1F_2	1,26	ubiquitin-protein ligase
id_2217	003658_1F_8	1,22	Protein
id_23136	035825_1F_2	1,3	GTP binding protein, putative [Ricinus communis]
id_23180	035927_1F_2	1,12	SRFR1
id_23185	035936_1C_4	1,3	unnamed protein product [Vitis vinifera]
id_2399	003859_3F_2	1,4	monooxygenase, putative [Ricinus communis]
id_24047	NP7275573	1,42	unknown [Medicago truncatula]
id_2442	003924_1C_5	1,3	NA
id_3573	005356_2F_2	1,29	protein kinase [Solanum tuberosum]
id_38	000015_8F_16	1,13	Dehydrin
id_4083	005755_110C_2	1,4	Protein brittle-1, chloroplast precursor, putative [Ricinus communis]
id_4400	005957_1C_3	1,65	NA
id_4411	005960_1C_5	1,28	unknown [Glycine max]
id_4722	006246_1F_11	1,16	DUF300 family protein [Nicotiana tabacum]
id_4827	006326_2F_2	1,13	NA
id_5568	007025_2F_8	1,19	PFT1
id_571	000992_1C_8	1,32	pft1
id_6032	007416_1F_8	1,2	monodehydroascorbate reductase, putative [Ricinus communis]

Id_6138	007510_1C_2	1,48	cytosolic monodehydroascorbate reductase
Id_7280	008474_1C_3	1,09	nadh-ubiquinone oxireductase
Id_7403	008571_2F_2	1,14	AT-HSFA7A
Id_818	001381_1C_6	1,5	ralf precursor
Id_8520	009477_1F_5	1,35	Disease resistance gene Rice
Id_10281	012045_2F_2	1,25	nbs1
Id_10454	012327_1F_3	1,11	RALFL33
Id_10805	012974_1C_9	1,26	monooxygenase FAD-binding
Id_11188	013578_1F_15	1,17	Protein
Id_11205	013600_1F_15	1,25	rhodanese-like family protein
Id_11337	013775_1F_4	1,4	brain protein 44-like protein
Id_11401	013867_1F_9	1,04	GRAS2 [Solanum lycopersicum]
Id_11709	014263_1F_2	1,2	HCF153 [Arabidopsis thaliana]
Id_12188	014965_1F_3	1,09	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
Id_1221	002200_1C_3	1,09	DNA binding / nuclease [Arabidopsis thaliana]
Id_12262	015087_1F_3	1,07	RabGAP/TBC domain-containing protein
Id_12473	015456_1C_2	1,38	putrescine N-methyltransferase [Solanum tuberosum]
Id_12795	015957_1F_5	1,12	chromodomain-helicase-dna-binding protein
Id_12893	016120_1F_9	1,19	tyrosine aminotransferase 2 [Solanum pennellii]
Id_13284	016715_1F_2	1,12	biopterin transport-related protein BT1 [Zea mays]
Id_13297	016729_1C_2	1,26	plasma membrane associated protein
Id_13756	017393_1F_4	1,09	Myc2 bHLH protein [Vitis vinifera]
Id_13914	017678_1F_7	1,25	polygalacturonase inhibitor
Id_13959	017766_2F_2	1,26	lanthionine synthetase c-like expressed
Id_14224	018181_1F_3	1,23	kelch repeat-containing serine threonine
Id_14336	018305_1F_2	1,33	phosphoesterase family protein
Id_14719	018849_1F_10	1,1	ripening-related p-450 enzyme
Id_15523	020038_1F_13	1,25	SAG101
Id_16150	021076_1F_4	1,11	agenet domain-containing protein bromo-adjacent
Id_16315	021542_4F_3	1,39	homology domain-containing
Id_17086	024967_1F_10	1,14	poly polymerase
Id_171	000202_1F_4	1,79	CDC5-like protein [Solanum lycopersicum]
Id_17216	025426_1F_4	1,33	bromodomain-containing protein, putative [Ricinus communis]
Id_17522	026215_1F_2	1,23	Calmodulin
Id_18196	027286_1F_6	1,55	galactose oxidase/kelch repeat domain-containing protein
Id_18747	028124_1F_4	1,41	exocyst complex component
Id_18944	028304_1C_10	1,17	resistance protein PSH-RGH6 [Solanum tuberosum]
Id_19037	028397_1F_4	1,42	sesquiterpene synthase [Fabiana imbricata]
Id_19365	028703_1F_4	1,05	protein phosphatase
Id_19692	029086_1C_4	1,07	NA
			Protein
			conserved hypothetical protein [Ricinus communis]

id_19780	029218_1C_5	1,27	tetratricopeptide repeat -containing protein
id_19927	029398_1F_2	1,66	LysM receptor-like kinase [Solanum lycopersicum]
id_20300	029894_1C_3	1,47	hypothetical protein [Solanum lycopersicum]
id_20391	030008_1F_6	1,12	strong similarity to arabidopsis rev3c (gb
id_20606	030280_1F_3	1,08	NA
id_20795	030594_1C_3	1,15	NA
id_210	000341_1C_12	1,26	basic helix-loop-helix family protein
id_21310	031778_1F_2	1,3	cytochrome p450
id_21438	031978_1C_3	1,18	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_21844	032721_1F_3	1,33	tubulin-like protein
id_21870	032781_1F_3	1,25	sequence-specific DNA binding protein
id_21951	032980_1F_5	1,26	NA
id_22792	034654_1F_4	1,08	ribosomal protein L12 family protein [Arabidopsis thaliana]
id_22871	034828_1F_4	1,58	ATIREG3 (IRON-REGULATED PROTEIN 3) [Arabidopsis thaliana]
id_22969	035126_1F_2	1,07	Glycosyltransferase
id_23490	036968_1F_2	1,04	3'-5' Exonuclease
id_23511	037033_1F_2	1,22	Cyclic AMP receptor, putative
id_236	000407_1F_2	1,19	patatin t5
id_23657	037588_1F_2	1,28	ent-kaurene oxidase
id_23687	037703_1F_2	1,16	chorismate mutase
id_23859	038404_1F_2	1,16	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase [Solanum lycopersicon]
id_23919	038603_1F_3	1,23	putative ethylene receptor protein [Solanum tuberosum]
id_24345	TC127131	1,13	Salt-tolerance protein, putative [Ricinus communis]
id_24361	TC127848	1,25	aspartate aminotransferase
id_24369	TC128042	1,2	ankyrin-like protein
id_24425	TC131501	1,14	early-responsive to dehydration erd
id_24517	TC137947	1,68	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]
id_2458	003936_3F_9	1,03	EMB1691
id_2653	004243_1F_16	1,31	PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]
id_396	000719_1F_2	1,15	novel protein with a thioesterase superfamily domain
id_3983	005679_2F_4	1,11	calmodulin-binding protein
id_4029	005721_1F_7	1,27	f-box kelch repeat-containing f-box family protein
id_4353	005914_2F_2	1,15	prenylated rab acceptor family protein
id_6285	007620_4F_4	1,35	NA
id_6518	007838_1F_12	1,06	aldo keto reductase family protein
id_7329	008511_1F_4	1,38	saur family protein
id_8064	009103_1F_2	1,26	nbs-lrr resistance protein
id_8272	009285_2F_33	1,12	12-oxophytodienoate reductase

Id_8958	009912_1F_18	1,11	mate efflux family protein
Id_9582	010845_1F_7	1,29	carotenoid isomerase
Id_9646	010934_1C_4	1,44	CM0216.450.nc [Lotus japonicus]
Id_10198	011945_1F_8	0,57	Protein
Id_10228	011973_2F_12	0,38	putative splicing regulatory protein
Id_10475	012363_1F_6	0,37	histidine phosphotransfer protein
Id_1076	001628_1F_36	0,3	Tubulin beta chain
Id_10968	013249_1F_4	0,51	cyclin dependent kinase a
Id_11159	013540_1F_2	0,65	serine threonine protein
Id_12000	014680_1F_9	0,28	NA
Id_12357	015252_1F_5	0,62	Protein
Id_12897	016153_1F_2	0,48	NSP-interacting kinase [Glycine max]
Id_13769	017405_1F_4	0,49	NA
Id_14303	018266_1F_7	0,96	glycosyl hydrolase family 17 protein
Id_14428	018437_1F_8	0,57	branched-chain amino acid aminotransferase
Id_14501	018546_1F_2	0,67	n -(beta-n-acetylglucosaminy)-l-asparaginase
Id_14905	019109_2F_32	0,47	tubulin beta-2 beta-3 chain
Id_14951	019168_1F_13	0,57	chromatin remodeling complex subunit
Id_15409	019860_2F_3	0,74	EDA7
Id_15424	019883_1F_2	0,18	ammonium transporter, putative [Ricinus communis]
Id_16014	020760_1C_5	0,5	NA
Id_18078	027131_1F_5	0,57	rad51b recombinase
Id_18226	027328_1C_3	0,88	Galactose-binding like [Medicago truncatula]
Id_18277	027402_1F_2	0,53	Microtubule-associated protein TORTIFOLIA1, putative
Id_1840	003120_6F_2	0,61	NA
Id_19255	028617_1F_3	0,79	abc transporter family expressed
Id_19301	028656_1F_5	0,75	NA
Id_1942	003234_5F_3	0,54	calcineurin b-like protein 3
Id_19967	029445_1F_3	0,93	bromodomain-containing protein [Ricinus communis]
Id_20223	029798_1F_4	0,62	Interleukin-1 receptor-associated kinase
Id_20839	030736_1F_4	0,44	transposon mutator sub- expressed
Id_21100	031476_1F_4	0,81	NA
Id_21558	032190_1F_2	0,63	nucleic acid binding
Id_22576	034176_1F_4	0,75	cysteine-type endopeptidase/ ubiquitin thiolesterase
Id_23495	036984_1F_2	0,43	secretory carrier-associated membrane protein 2
Id_23589	037364_1F_2	0,62	branched-chain amino acid aminotransferase
Id_23734	037914_1F_2	0,77	nbs-coding resistance gene analog
Id_23998	NP7260462	0,33	Histone H3; Histone-fold
Id_2762	004380_1F_3	0,6	udp-galactose transporter 3
Id_3386	005064_1F_59	0,94	Caltractin
Id_3500	005253_1F_24	0,38	ran binding protein

id_3608	005398_2C_4	0,37	NA
id_3981	005678_1F_3	0,78	stress-associated protein 8 [Solanum pennellii]
id_5208	006699_1F_3	0,6	putative transcription regulator CPL1 [Solanum lycopersicum]
id_559	000967_5F_87	0,57	Calreticulin
id_5902	007318_3C_2	0,66	protein binding
id_5904	007319_1F_5	0,51	aspartate--trna ligase
id_6452	007769_1F_14	0,49	single myb histone
id_6938	008185_1C_5	0,61	pentatricopeptide repeat-containing protein
id_7199	008412_1F_3	0,76	acireductone dioxygenase
id_8430	009403_1F_8	0,36	putative subtilisin serine protease [Arabidopsis thaliana]
id_8471	009436_1F_8	0,53	electron transport SCO1/SenC family protein
id_8978	009936_1F_19	0,77	diaminopimelate epimerase family protein
id_9336	010492_1F_9	0,46	Trafficking protein particle complex subunit
id_9788	011164_5F_3	0,87	dj-1 family protein
id_10092	011760_1F_14	0,81	hydrolyzing o-glycosyl
id_10182	011915_1F_4	0,78	beta-hexosaminidase 2 [Solanum lycopersicum]
id_104	000032_1F_53	0,52	glycolate oxidase
id_10552	012504_1F_2	0,8	NA
id_10991	013288_2F_3	0,53	nucellin-like aspartic protease
id_10995	013299_1F_6	0,74	hsp like protein
id_11192	013582_1C_2	0,95	NA
id_11335	013774_1F_2	0,78	28 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic
id_11429	013903_1F_3	0,72	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
id_11501	013970_1C_2	0,69	NA
id_11644	014195_1F_14	0,58	thylakoid luminal kda chloroplast
id_12088	014795_1C_2	0,85	NA
id_12187	014964_2F_16	0,57	RNA-binding protein, putative [Ricinus communis]
id_12190	014967_1C_2	0,83	mitochondrial transcription termination factor-like
id_12575	015661_1F_3	0,64	unnamed protein product [Vitis vinifera]
id_12598	015686_1F_17	0,66	mevalonate kinase
id_13109	016450_1F_2	0,9	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_15112	019411_2F_4	0,74	f-box family protein
id_15161	019512_1F_2	0,88	squamosa promoter binding protein-like protein
id_15230	019588_1F_3	0,59	APO protein 2, chloroplast precursor
id_15347	019768_1C_6	0,73	gyf domain-containing protein
id_15594	020124_2F_15	0,47	acyltransferase, putative [Ricinus communis]
id_15873	020539_1F_6	0,78	glycine cleavage t protein (aminomethyl transferase)
id_15877	020544_2F_11	0,93	programmed cell death 2 c-terminal domain-containing protein
id_16047	020850_1F_4	0,62	wall-associated kinase, putative [Ricinus communis]
id_1608	002920_1F_3	0,56	NA

Id_16081	020912_1F_17	0,54	Protein
Id_16231	021291_3F_5	0,65	galactosyl transferase gma12 mnn10 family protein
Id_164	000196_2F_12	0,69	CP12-3 [Arabidopsis thaliana]
Id_16691	023807_1F_7	0,95	zinc finger
Id_16952	024577_1F_4	0,7	NA
Id_17219	025443_1F_2	0,71	ATP-dependent RNA helicase, putative [Ricinus communis]
Id_17610	026409_1F_5	0,61	sugar transporter, putative [Ricinus communis]
Id_17972	026967_1F_4	0,96	cinnamoyl-CoA reductase, putative [Ricinus communis]
Id_18451	027663_1F_3	0,76	n-acetylglucosaminyltransferase iii
Id_18461	027683_1C_3	0,72	dehydration-responsive protein-related
Id_18579	027865_1F_7	0,3	peroxidase atp8a
Id_18803	028174_1F_3	0,75	hydroxyphenylpyruvate reductase
Id_18858	028227_2F_4	0,31	antigen receptor
Id_19552	028899_1F_3	0,71	Protein
Id_20046	029539_1F_3	0,88	NA
Id_20366	029982_1F_4	0,82	phospholipase a2
Id_20641	030321_1F_3	0,77	f-actin capping protein
Id_20680	030395_1F_4	0,88	Protein
Id_20797	030595_1F_5	0,79	dna methyltransferase
Id_20932	031015_1F_8	0,63	unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Id_21048	031396_1F_5	0,88	NA
Id_21342	031824_1F_8	0,4	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain
Id_2207	003652_7F_4	0,72	NA
Id_22352	033758_1F_2	0,82	glycosyl transferase family 1 protein
Id_22586	034196_1F_2	0,72	amidase [Cucumis melo subsp. melo]
Id_22649	034394_1F_4	0,88	NA
Id_23603	037406_1F_2	0,74	bhlh transcription factor
Id_23616	037453_1F_2	0,96	(+)-delta-cadinene synthase isozyme
Id_23907	038591_1F_4	0,67	phytochrome b
Id_24570		0,99	
Id_2518	004011_1F_8	0,78	predicted protein [Populus trichocarpa]
Id_2683	004292_1C_42	0,77	iq calmodulin-binding motif family protein
Id_2794	004417_1F_11	0,63	actin-depolymerizing factor
Id_3323	004988_1F_8	0,57	legume lectin family protein
Id_3479	005222_1F_5	0,58	glyoxalase bleomycin resistance protein dioxygenase
Id_3675	005453_1F_5	0,51	sugar transporter, putative [Ricinus communis]
Id_4363	005924_1F_3	0,68	THE1
Id_4796	006304_1F_6	0,9	heat shock protein
Id_5021	006529_1F_13	0,68	anthocyanin acyltransferase [Solanum lycopersicum]
id_5341	006795_1F_2	0,57	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140

id_5676	007135_1F_17	0,61	pyruvate dehydrogenase e1 beta subunit
id_5827	007257_1F_76	0,82	psi type iii chlorophyll a b-binding protein
id_5891	007302_1F_2	0,96	NA
id_5959	007371_1F_4	0,89	cyclin-related [Arabidopsis thaliana]
id_6639	007966_2F_5	0,63	Triacylglycerol lipase 1 precursor, putative [Ricinus communis]
id_6663	007990_1F_53	0,65	hsc70-interacting protein
id_6987	008224_1C_27	0,94	glycine-rich protein
id_7050	008278_2C_2	0,89	BHLH16 [Lotus japonicus]
id_7261	008460_1F_8	0,75	at4g01050 f2n1_31
id_7790	008864_1F_4	0,91	NA
id_8009	009056_1C_6	0,88	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_8065	009104_1C_4	0,97	microtubule-associated protein rp eb family member 3
id_8141	009164_1C_4	0,75	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
id_8396	009377_1F_7	0,38	kinesin-like protein
id_8431	009404_1F_134	0,81	33kda precursor protein of oxygen-evolving complex
id_8736	009673_2F_21	0,89	uv excision repair protein
id_885	001488_2F_3	0,88	CPSF30
id_9064	010097_1F_2	0,34	f-box family protein
id_9067	010109_1F_6	0,45	h aca ribonucleoprotein complex subunit 3-like protein
id_9295	010443_1F_5	0,61	glycine dehydrogenase, putative [Ricinus communis]
id_9745	011075_1F_16	0,22	dehydroascorbate reductase
id_9902	011356_1C_28	0,67	adenylate cyclase