

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

31 Gennaio 2008
Filippo De Franceschi



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI
INDIRIZZO AGROBIOTECNOLOGIE - CICLO XX
Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti nel processo di abscissione in frutti di melo (*Malus domestica* L. Borkh)

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Supervisor : Ch.mo Prof. Angelo Ramina
Dr Benedetto Ruperti

Dottorando: Filippo De Franceschi

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato, supportato e sopportato durante il dottorato: la mia famiglia, la mia ragazza Chiara, i miei amici, i miei colleghi del laboratorio di Legnaro, Alessandro, Maura, Fabio, e tutti gli altri che non nomino per motivi di spazio e tempo.

Desidero inoltre ringraziare il Prof. Angelo Ramina, il Dr. Benedetto Ruperti e il Dr. Claudio Bonghi per l'aiuto fisico e morale durante la stesura e correzione della tesi.

Ringrazio anche i miei colleghi dell'Università del Wisconsin-Madison a partire dalla Prof. Sara Patterson, ma anche Brad Binder, Carl-Erik Tornqvist, Hongyu Rao, Joonyup Kim, Amber Robertson, Brian Walsh, Ed Woolsey e tutti gli amici che ho conosciuto negli Stati Uniti per l'ospitalità e l'aiuto che mi hanno dato.

INDICE

INDICE	7
RIASSUNTO	9
ABSTRACT	13
1. INTRODUZIONE	17
1.1 PREMESSA	17
1.2 DIRADAMENTO CHIMICO	18
1.3 ABSCISSIONE	22
1.3.1 Differenziamento Della Zona Di Abscissione	22
1.3.2 Cambiamenti Nell'espressione Genica	26
1.3.3 Abscissione In Arabidopsis	29
1.4 ORMONI ED ABSCISSIONE	34
1.4.1 Etilene E Abscissione	34
1.4.2 Auxina E Abscissione	36
1.5 CASCOLA FISIOLOGICA DEI FRUTTICINI IN <i>Malus domestica</i>	38
1.6 APPROCCIO MASSIVO NELLO STUDIO DELL'ABSCISSIONE	44
1.6.1 Differential Display	44
1.6.2 cDNA-AFLP	46
1.7 SCOPO DELLA TESI	49
2. MATERIALI E METODI	51
2.1 <i>Malus domestica</i>	51
2.1.1 Materiale Vegetale	51
2.1.2 Estrazione Di Rna	52
2.1.3 Analisi cDNA-AFLP	53
2.1.3.1 Sintesi del cDNA	53
2.1.3.2 Restrizione e ligazione	53
2.1.3.3 Preamplificazione	54
2.1.3.4 Marcatura	54
2.1.3.5 Amplificazione selettiva	54
2.1.4 Sequenziamento	56
2.1.4.1 Selezione bande e riamplicazione	56
2.1.4.2 Ligazione, Trasformazione, Clonaggio, Sequenziamento	57
2.1.5 Analisi Di Espressione	57
2.1.5.1 Sintesi cDNA a singolo filamento	57
2.1.5.2 PCR semi-quantitativa	58
2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
2.2.1 Materiale Vegetale	59

2.2.2 Risposte All'etilene	60
2.2.3 Estrazione Acidi Nucleici	60
2.2.4 Genotipizzazione Linee Salk	61
2.2.4 Analisi Di Espressione	63
2.2.4.1 Sintesi del cDNA	63
2.2.4.2 Real Time PCR	63
3. RISULTATI	67
3.1 ANALISI cDNA-AFLP E GENE ONTOLOGY	67
3.2 GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI DURANTE L'ABSCISSIONE	71
3.2.1 Metabolismo dei carboidrati	71
3.2.2 Attività mitocondriale, plastidiale e delle endomembrane	72
3.2.3 Attività di legame, idrolitica e chinasica	73
3.2.4 Metabolismo proteico, attività di trasporto e trasduzione del segnale	75
3.2.5 Sviluppo	76
3.2.6 Espressione genica di EST relative al controllo ormonale	76
3.3 ANALISI DI ESPRESSIONE	77
3.3.1 Selezione dei geni di interesse	77
3.3.2 Geni coinvolti nel metabolismo degli zuccheri e differenzialmente espressi	82
3.3.3 Andamenti dell'espressione dei geni del metabolismo proteico	89
3.3.4 Espressione di geni deputati al mantenimento del cloroplasto	90
3.3.5 Espressione di geni coinvolti nel metabolismo e trasduzione del segnale delle auxine	91
3.4 Analisi e studio di geni di Arabidopsis omologhi a quelli associati all'abscissione in melo	93
3.4.1 Valutazione e ricerca di fenotipi per abscissione disturbata in mutanti di Arabidopsis	93
3.4.2 Trattamenti con etilene	98
3.4.3 Analisi di espressione su piante mutanti <i>dab4-1</i> , <i>dab5-1</i> e <i>ida</i>	100
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	107
4.1 DISCUSSIONE	107
4.1.1 L'induzione dell'abscissione influisce prevalentemente sul profilo trascrizionale della cortex.	107
4.1.2 Il controllo ormonale dell'abscissione	108
4.1.3 Livello di carboidrati	110
4.1.4 Interazione tra stato ormonale e metabolismo degli zuccheri	113
4.1.5 Correlazioni tra abscissione e senescenza nei frutticini	115
4.1.6 Analisi di espressione in mutanti con abscissione disturbata in Arabidopsis thaliana	116
4.2 CONCLUSIONI	118
4.2.1 Prospettive future	121
5. BIBLIOGRAFIA	123
ALLEGATO A - TABELLA A.1	137
ALLEGATO B - FIGURE B.1-18	157

RIASSUNTO

Numerose specie frutticole presentano una quantità eccessiva di fiori che, a loro volta, producono un elevato numero di frutti che non trovano un adeguato apporto nutrizionale da parte dell'albero. Per far fronte a tale situazione, le principali specie da frutto hanno sviluppato un meccanismo di autoregolazione che attraverso la cascola fisiologica consente all'albero di dimensionare la popolazione di frutti alle sue effettive capacità nutrizionali. Tale processo, che è finalizzato a sostenere lo sviluppo del seme e di garantire la disseminazione, non è tuttavia sufficiente per garantire la produzione di frutti con pezzature commercialmente utili. Nel melo, la cascola naturale può essere efficacemente amplificata tramite l'impiego di composti chimici come l'acido naftalenacetico (NAA), la sua amide (NAD) e la benziladenina (BA), applicati entro 5-6 settimane dalla piena fioritura. L'azione diradante di questi bioregolatori è variabile e fortemente influenzata sia dalle condizioni ambientali che dal genotipo. Nel melo si possono trovare varietà facili da diradare ed altre in cui non viene riscontrato alcun effetto diradante, nemmeno impiegando composti diversi o combinazioni di essi. La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'abscissione potrebbe consentire di mettere a punto nuove strategie di diradamento, di individuare diradanti chimici più efficaci e di selezionare genotipi con una più accentuata capacità di auto-regolazione della carica dei frutti.

La ricerca oggetto di questa dissertazione è stata volta a chiarire gli eventi molecolari coinvolti nell'abscissione dei frutticini *in planta*, considerando le caratteristiche specifiche di questo sistema e l'importanza pratica del diradamento in melo.

La cascola dei frutticini è causata dall'attivazione di specifici strati cellulari, denominati zone di abscissione (AZ), ed è un processo altamente regolato e attivato da stimoli interni ed ambientali. L'origine dei segnali responsabili dell'attivazione delle AZ resta tuttora da definire. Tra gli ormoni vegetali, l'etilene stimola l'abscissione in numerose specie e sistemi, come anche in melo, mentre le auxine

prodotte dai semi contribuiscono a mantenere una condizione di insensibilità nei confronti dell'etilene e prevengono l'abscissione. Nel melo la cascola fisiologica dei frutticini è dovuta all'attivazione delle AZ situate alla base del peduncolo a livello della sua giunzione nel mazzetto. In questa regione anatomica si inseriscono quattro frutticini laterali, uno centrale e il germoglio. Il frutto centrale deriva dall'impollinazione del fiore denominato *king flower* che, fiorendo anticipatamente, dà origine ad un frutto generalmente più grande rispetto ai laterali. Nel corso della cascola fisiologica si ipotizza che il germoglio competa per gli assimilati con i frutticini. Considerando che i semi e/o i frutti sono coinvolti nel determinismo del segnale di abscissione e che la risposta morfogenetica si verifica a livello delle AZ, risulta fondamentale analizzare tale sistema *in toto* includendo semi, cortex, peduncoli e AZ. E' generalmente accettato che l'interazione tra etilene e auxine giochi un ruolo fondamentale nella regolazione dell'abscissione. Partendo da questo presupposto, in questo lavoro è stato adottato un approccio massivo per identificare i geni che svolgono una funzione regolativa dell'abscissione. La tecnica cDNA-AFLP è stata utilizzata per determinare il profilo trascrizionale di geni differenzialmente espressi durante l'abscissione di frutticini di melo. Sono stati così isolati 278 cloni differenzialmente espressi confrontando le due popolazioni di frutticini abscidenti (AF) e non abscidenti (NAF). Gli AF sono stati ottenuti da frutticini laterali di alberi trattati con benziladenina (BA) a 200 ppm, 17 giorni dopo la caduta dei petali (diametro medio dei frutti 10-12 mm). I NAF sono stati ottenuti da frutti derivanti da *king flower* di mazzetti dove tutti i fiori laterali erano stati rimossi alla fioritura.

Le EST (*expressed sequence tag*) ottenute sono state annotate con la terminologia specifica secondo i tre sottovocabolari principali della Gene Ontology: componente cellulare, processo biologico e funzione molecolare. Considerando la componente cellulare, il maggior numero di geni espressi in cortex sono risultati relativi a mitocondri, plastidi e membrane. Riguardo alla funzione molecolare, i più espressi hanno mostrato attività transferasica e di legame nella cortex, idrolasica e di trasporto nei semi e di legame nei peduncoli. Considerando il processo biologico, nella cortex sono apparsi abbondanti i geni coinvolti nel trasporto e nel

metabolismo proteico e dei carboidrati. In generale, considerando i tre criteri ontologici, nel seme è stata descritta una prominente regolazione positiva dei geni individuati. Questo avvalorava l'ipotesi di un ruolo regolativo importante svolto dal seme nel determinismo del segnale abscissione.

Sono state condotte analisi funzionali e di espressione dei geni più interessanti con RT-PCR semiquantitativa su gel di agarosio su cDNA ottenuti da semi, cortex, peduncolo e zone di abscissione di AF e NAF.

Le analisi di espressione hanno confermato l'efficacia dell'approccio basato sul cDNA-AFLP nel consentire l'individuazione di una grande quantità di EST differenzialmente espresse e il coinvolgimento dei geni studiati nella regolazione dei processi di abscissione e senescenza. In particolare, l'espressione differenziale di geni relativi al metabolismo degli zuccheri e di geni coinvolti nelle vie di segnalazione ormonale ha confermato l'importanza dei carboidrati e degli ormoni nel controllare l'induzione delle AZ.

Poiché non si possono facilmente condurre esperimenti di carattere funzionale (ad esempio, silenziamento o overespressione di geni) su alberi, sono stati condotti ulteriori studi su *Arabidopsis thaliana* per verificare se i geni, individuati tramite cDNA-AFLP nel melo, sono coinvolti anche nell'abscissione di *Arabidopsis*. A questo scopo, sono stati identificati i geni di *Arabidopsis* putativamente omologhi a quelli differenzialmente espressi nel melo. Sono stati tentati due approcci per studiare la loro funzione nell'abscissione. In un primo momento, sono stati ottenuti mutanti inserzionali (T-DNA) omozigoti, per i quali è stata valutata la presenza di eventuali fenotipi per l'abscissione. Probabilmente a causa della ridondanza genica, non sono stati rinvenuti fenotipi di questo genere. Successivamente, quindi, sono state condotte analisi di espressione con *real time* RT-PCR su zone di abscissione di mutanti con abscissione ritardata (*dab4-1* e *dab5-1*) o assente (*ida*). I risultati hanno evidenziato un differente pattern di espressione tra mutanti e piante *wild type*, confermando un coinvolgimento di questi geni nell'abscissione. Ulteriori ricerche consentiranno di meglio caratterizzare il ruolo svolto da questi geni nella regolazione dell'abscissione degli organi fiorali in *Arabidopsis*. Inoltre, tenendo

conto dell'elevato numero di EST di melo disponibili in *data base* pubblici, potrà essere sviluppato un *array* abscissione specifico, che potrà essere utilizzato per studi di trascrittomici, per l'individuazione di nuovi e più efficaci principi attivi ed in programmi di selezione volti all'individuazione di genotipi autodiradanti.

ABSTRACT

Many fruit species bear an abundance of flowers producing a surplus of fruits that the tree is unable to support. In anticipation of this, the major fruit species developed an immature fruit (fruitlet) physiological drop as a self-regulatory mechanism. This process is, at least in part, a consequence of the competition among fruits and between fruits and shoots for carbon assimilates. The self-regulatory mechanism responsible for the immature apple fruit shedding may be magnified by chemicals such as naphthaleneacetic acid (NAA) and its amide (NAD), and benzylaminopurine (BA) sprayed within 5–6 weeks after full bloom. The thinning action of bioregulators is quite variable and depends on environmental conditions and genotypes. In apple, there are varieties easy to thin and others difficult even though different chemicals or combinations of them are used. Understanding the molecular mechanisms and processes involved in abscission might help in finding new approaches and new chemical thinners to control abscission in fruit, or new self-thinning varieties.

The described research was aimed to elucidate the molecular events underlying the *in planta* fruitlet abscission, taking into account the characteristics of this system and the practical importance of thinning in apple.

Fruit drop is due to the activation of specific abscission zones (AZs). It is accepted that abscission is a highly regulated developmental process that is both influenced and activated in response to internal cues and/or environmental conditions. Nevertheless, the identity of the signals responsible for the activation of the AZ is as yet unknown. Among phytohormones, ethylene enhances abscission in several species and systems as well as in apple, while auxins produced by seeds are thought to desensitize AZs to ethylene and prevent abscission. In apple trees, the fruitlet physiological drop is due to the activation of the AZ located at the junction of the peduncle into the twig. In this region four lateral (LF) and one central (CF) fruitlets and the shoot are inserted. The CF comes from the pollinated king flower (KF) that, since it blooms earlier within the cluster, originates a fruitlet larger than the lateral

ones. During the physiological drop, the shoot at cluster side, is thought to be a sink in competition with fruitlets for assimilate supply. Considering that seeds and/or fruits are involved in determining the shedding signal while the morphogenetic response occurs always at the AZ level, it is crucial to analyse the whole fruitlet system involved in abscission that should include concurrently seed, cortex, peduncle, and AZ. It is generally believed that the interaction between ethylene and auxin plays a major regulatory role in abscission. Starting from this, a mass gene approach was used in this work to identify genes regulating or involved in abscission. The cDNA-AFLP technique was adopted for transcriptional profiling of differentially expressed genes during apple fruitlet abscission. This allowed the isolation of 278 differential clones by comparing expression profiles of abscising (AF) versus non-abscising (NAF) fruitlet populations. AFs were obtained from lateral fruitlets of trees sprayed with benzylaminopurine (BA) at 200 ppm, 17 days after petal fall (APF) when the fruit cross diameter was about 10-12 mm. NAF originated from central flowers grown in clusters where all the lateral flowers had been removed at bloom.

All ESTs (expressed sequence tags) obtained have been annotated with the Gene Ontology vocabulary and grouped according to cellular components, biological processes and molecular functions. Considering the cellular components, the most affected genes in the cortex were related to mitochondrion, plastid and membranes. Concerning the molecular functions, the mostly affected ones were the binding and the transferase activities in the cortex, the hydrolase and transport activities in the seed, and the binding activity in the peduncle. Considering the biological process, in the cortex the most abundant genes were those controlling transport, protein and carbohydrate metabolism. As a general remark, taking into account all the three ontology criteria, it appeared that a prominent up-regulation occurred in the seed. This might be consistent with the determinant role attributed to the seed in the regulation of fruit abscission.

The expression and functional analyses of the most interesting clones were carried out by semiquantitative RT-PCR on agarose gel on cDNA obtained from seeds,

cortex, peduncles and AZs of AFs and NAFs.

Expression analyses confirmed the efficacy of the cDNA-AFLP approach to find a large amount of differentially expressed ESTs and the involvement of the studied genes in regulating the abscission and senescence processes. In particular the differential expression of sugar-metabolism and signalling related genes confirmed the importance of carbohydrates, together with hormones, in controlling the induction of AZs.

Since functional studies through silencing or overexpression approaches cannot be easily performed on trees, additional experiments were carried out in *Arabidopsis thaliana* to investigate the participation of these and other genes in abscission. To this end, *Arabidopsis* genes putatively homologous to those differentially expressed in relation to fruitlet abscission in apple were identified. A dual approach was chosen to study their function in abscission. In a first attempt, insertional (T-DNA) homozygous mutants were obtained and scored for the presence of abscission-related phenotypes. Probably due to gene redundancy, no phenotypes were detected. Therefore, expression analyses were carried out on the same genes with real time RT-PCR on abscission zones of known *Arabidopsis* mutants with delayed (*dab4-1*, *dab5-1*) or no petal abscission (*ida*). The results showed a different pattern of expression in comparison to that found in wild type and confirmed an involvement of these genes in abscission. Current work is devoted to further characterise the putative role played by these genes in regulating the abscission of flower organs in *Arabidopsis*. In addition, a “systematic” approach for the analysis of the whole apple fruitlet abscission transcriptome is needed. To this end an apple microarray is being developed from the large number of already available ESTs, to be used for screening of new chemical thinners and for marker assisted selection of self thinning genotypes.

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

Molte specie arboree producono una sovrabbondanza di fiori e frutti che l'albero non è in grado di portare a maturazione. Per questo motivo la maggior parte delle specie ha sviluppato un meccanismo di autoregolazione della carica, denominato cascola fisiologica dei frutti immaturi, che rappresenta un processo altamente regolato da un punto di vista biochimico, molecolare e genetico. In melo la cascola fisiologica avviene nel periodo compreso tra la fine di Maggio e la prima metà di Giugno, quando i frutticini raggiungono una dimensione di circa 10-15 mm di diametro. La caduta è preceduta da un rallentamento della crescita dei frutti destinati ad abscindere, ed è dovuta all'attivazione delle zone di abscissione (Roberts et al., 2002). E' noto che i segnali di attivazione del processo sono endogeni al corimbo, prodotti dai semi e dal frutto, e controllati da fattori ambientali (Taylor and Whitelaw, 2001).

Il processo di abscissione è particolarmente interessante dal punto di vista agronomico in tutte le specie coltivate, per lo studio di varietà con cascola dei frutti ritardata o anticipata allo scopo di migliorare la produzione. Nel caso del melo il processo è interessante per la regolazione di due importanti aspetti: la dimensione dei frutti e il fenomeno dell'alternanza.

Le attuali esigenze di mercato richiedono sempre di più frutta di una certa pezzatura, omogeneità, colore e forma che rendono il diradamento chimico, la stimolazione della cascola mediante agenti chimici, una delle pratiche agronomiche più importanti per il bilancio dell'azienda frutticola. Infatti, la cascola naturale non è da sola sufficiente a garantire una adeguata pezzatura dei frutti per cui essa viene amplificata utilizzando molecole che ne aumentino l'entità. Per questo tale tecnica colturale si è da tempo affermata, in quanto permette di migliorare la qualità intrinseca ed estrinseca dei frutti, garantendo nello stesso tempo la produzione per l'anno successivo perché tende a ridurre l'alternanza di produzione. Tale fenomeno

è causato da uno squilibrio ormonale che si viene a creare all'interno della pianta fra le gibberelline, che hanno un'azione inibitrice dell'induzione a fiore e le auxine e citochinine che svolgono invece un'azione stimolatrice.

Le gibberelline vengono prodotte sia dai germogli in accrescimento quanto dai semi in via di sviluppo. Risulta pertanto intuitivo come, sia un'abbondante carica di frutti, e, quindi, la presenza di un elevato numero di semi produttori gibberelline, così come un lussureggiamento eccessivo della vegetazione con numerosi germogli in rapido accrescimento, siano fattori contrastanti l'induzione a fiore per l'anno successivo. E' noto infatti che nel melo la transizione di fase avviene (seconda/terza decade di Giugno) contestualmente con il periodo di più intensa attività morfogenetica dei germogli.

Il diradamento manuale non è economicamente proponibile per correggere la carica dei frutti. Rimangono quindi di fondamentale importanza gli interventi con prodotti di sintesi effettuati in momenti e a dosi diverse. Oggi il diradamento chimico, nonostante sia pratica ormai comune, è ancora il trattamento di maggiore importanza e più difficile da effettuare. Per ogni prodotto e varietà da trattare esistono, infatti, modalità di applicazione, specificità del trattamento e condizioni di utilizzo da considerare con estrema attenzione.

1.2 DIRADAMENTO CHIMICO

Nella maggior parte delle aree frutticole i produttori devono convivere con il rischio di brinate tardive e perciò il diradamento dei fiori assume un elemento di forte rischio. L'unica concreta alternativa è rappresentata dal diradamento chimico dei frutticini. Esso sfrutta la naturale tendenza degli alberi ad auto-regolare la carica inducendo la cascola dei frutti più deboli in favore di quelli più sviluppati. Alberi non diradati artificialmente perdono dal 20 al 70% dei loro frutticini durante la cascola in relazione all'intensità di fioritura di partenza. Tuttavia tale riduzione non è ancora sufficiente. Applicando diradanti chimici questa tendenza alla

gerarchizzazione dei frutti viene aumentata di un ulteriore 10-20%, quanto basta per passare da una produzione di basso valore commerciale ad una di maggior pregio.

I diradanti chimici applicati al melo possono essere divisi in due categorie in base all'epoca di intervento: diradanti in fioritura e diradanti in post-fioritura.

Per quanto riguarda i diradanti in fioritura, sono utilizzati, nella produzione biologica, il polisolfuro di calcio e l'ammonio tiosolfato (ATS), che agiscono sui fiori aperti non ancora fecondati provocando ustioni sugli organi riproduttivi. I fiori chiusi o già fecondati non vengono interessati da questa azione, di conseguenza l'epoca di applicazione deve tener conto di questo, soprattutto per preservare completamente i fiori centrali del mazzetto. Altro diradante florale è l'ethephon (acido 2-cloro etilfosfonico), che in condizioni di pH superiore a 4,5 va incontro a disintegrazione liberando etilene ed esercitando un'azione caustica su alcuni organi fiorali (stigma e stili). Come per tutti i diradanti chimici anche l'attività dell'ethephon è influenzata dalle condizioni meteorologiche e, visto il momento precoce di applicazione, il suo impiego è rischioso a causa della scarsa selettività sul mazzetto florale che può causare un effetto diradante nullo o eccessivo.

Nonostante i diradanti fiorali siano estremamente efficaci nel contrastare il fenomeno dell'alternanza, in quando vengono applicati precocemente, sono di più difficile utilizzo ed hanno una scarsa selettività e bassa efficienza. Per questo motivo sono più comunemente utilizzati i diradanti di post-fioritura che agiscono amplificando la cascola naturale dei frutticini ed appartengono a categorie di composti auxino- o citochinino-simili.

I prodotti ormonali più utilizzati come diradanti post-fiorali sono tra gli auxinici quelli a base di acido naftalenacetico (NAA, acido 2,1-naftilacetico) e della sua amide (NAD). Il loro meccanismo di azione è simile: essi provocano una riduzione dell'attività fotosintetica, quindi una mancata traslocazione delle sostanze nutritive verso i semi che vanno incontro così ad aborto. I frutti più piccoli e più deboli non riescono a competere con gli altri e vanno incontro a cascola (Luckwill, 1953). Il NAD, rispetto ad NAA, presenta un'attività molto più lenta e più prolungata nel tempo (di alcuni giorni rispetto ad alcune ore dell'NAA). Questa attività viene

esaltata nelle piante vigorose e in determinate condizioni meteorologiche quali elevata umidità relativa dell'aria soprattutto nei giorni che seguono il trattamento e con temperature superiori ai 18-20 °C. In genere fra i due prodotti, il NAD è certamente quello più utilizzato per il trattamento effettuato a partire dalla caduta dei petali fino ad un diametro medio del frutticino centrale (inserito su legno di due anni) compreso fra i 4 e i 6 mm. L'NAA viene impiegato quando non si presentano le condizioni ottimali per il NAD in particolare se le cattive condizioni meteorologiche fanno ritardare troppo l'intervento, in tal caso si ricorre a questa molecola che va utilizzata quando il frutticino centrale raggiunge un diametro di 8-12 mm. L'NAA può essere distribuito da solo o in miscela con carbaryl. Il carbaryl (1-naftilmetilcarbammato) è stato sviluppato inizialmente come insetticida appartenente alla classe dei carbammati ed in seguito è stato utilizzato come diradante la cui azione comporta un rallentamento di traslocazione dei metaboliti verso i frutti e una elevata produzione endogena di etilene (ormone responsabile dell'abscissione). Da solo ha un'azione piuttosto blanda, per questo viene utilizzato in miscela con NAA o benziladenina (BA) o per completare l'azione del NAD. Il carbaryl viene utilizzato quando i frutticini centrali hanno raggiunto un diametro medio compreso fra i 12-15 mm. Anche per il carbaryl l'effetto diradante è strettamente legato alle condizioni meteorologiche che seguono il trattamento, in particolare la sua azione è esaltata da condizioni di elevate temperature e clima piuttosto secco. Non deve essere dimenticato che carbaryl è un insetticida e come tale presenta una tossicità acuta sia verso l'uomo (DL50 200-850 mg/kg) sia verso animali ed insetti utili. Soprattutto per questo motivo, oltre che per la ridotta efficacia, è preferibile utilizzare altri diradanti chimici. Costi elevati, efficacia limitata e tossicità di alcuni composti che devono essere ritirati, hanno contribuito all'incremento della sperimentazione di altri diradanti, focalizzando l'attenzione su benziladenina (BA), ammonio tiosolfato (ATS) e ethephon, molecole a basso impatto ambientale. La BA è una citochinina sintetica inizialmente utilizzata come fitoregolatore ad azione cosmetica su frutti di Red Delicious e Golden Delicious. La sua azione come diradante è legata all'inibizione dell'attività fotosintetica e, quindi,

ad una minore traslocazione di fotosintati verso i frutti durante le ore notturne (Wang et al., 1998). Oltre a favorire la cascola, la BA stimola la divisione cellulare e promuove la crescita dei frutti in modo diretto, predisponendo la pianta alla produzione di frutti di medie/grosse dimensioni (oltre gli 80mm di diametro) in particolare per le cultivar Golden Delicious e Gala (Dorigoni, 2003).

La risposta al trattamento dipende oltre che dal principio attivo, anche dal tipo di interazione ormonale tra i singoli frutticini e tra il mazzetto di frutti e il germoglio laterale (Bangerth, 2000). In melo, infatti, l'attivazione delle zone di abscissione è altamente regolata dalla produzione di ormoni e dalla capacità di richiamo dei fotosintati del frutto centrale (derivante dal *King Flower*) e dei laterali. Oltre a questa competizione tra i frutti nel corimbo, è da considerare estremamente influente anche la competizione del germoglio laterale con l'intero mazzetto.

Un buon diradante chimico agisce incrementando la competizione esistente tra il germoglio laterale e i frutticini, esaltando le competizioni che si stabiliscono tra il frutto centrale e i laterali nel richiamo degli assimilati, rafforzando il processo di gerarchizzazione tra frutti nell'ambito del corimbo, che è alla base della cascola fisiologica. Poiché non tutte le varietà di melo rispondono allo stesso modo al trattamento con diradanti chimici è utile e possibile agire usando combinazioni di due o più diradanti (Wertheim, 2000). La benziladenina è spesso usata insieme a carbaryl, NAA o NAD, i migliori candidati a rafforzarne l'azione. Inoltre in combinazione con le suddette molecole l'efficacia diradante della BA è di molto superiore a qualsiasi altro diradante grazie all'azione sinergica dei composti, all'assenza di fenomeni negativi di stress della pianta e all'effetto positivo sull'accrescimento dei frutti.

1.3 ABSCISSIONE

L'abscissione è un processo fisiologico altamente regolato, indotto da stimoli di diversa natura (endogeni e/o ambientali), che porta al distacco di organi o parti di essi dalla pianta e che assume differenti significati fisiologici ed ecologici. Essa infatti rappresenta un meccanismo per rimuovere frutti maturi ed assicurare la dispersione dei semi e per eliminare organi danneggiati o infettati da patogeni o senescenti (petali, sepali, stami, frutticini e foglie) e/o non più funzionali. L'eliminazione degli organi avviene in seguito all'attivazione di specifici enzimi idrolitici, responsabili della progressiva degenerazione della parete cellulare di alcuni strati di cellule che prendono il nome di zona di abscissione (AZ).

Il processo, altamente regolato da complesse interazioni ormonali, si compie attraverso quattro passaggi principali: (a) determinazione dell'AZ; (b) acquisizione della competenza, da parte delle cellule dell'AZ, a rispondere a stimoli che inducono l'abscissione; (c) attivazione dell'AZ e separazione cellulare; (d) suberificazione delle cellule nella zona prossimale (Patterson, 2001).

1.3.1 Differenziamento Della Zona Di Abscissione

E' stato dimostrato che l'abscissione avviene normalmente in posizioni predeterminate formate da cellule che hanno subito uno specifico evento di differenziazione (Gonzalez-Carranza et al., 1998). La peculiarità morfologica delle cellule dell'AZ determina la precisione con cui avviene la separazione cellulare durante il distacco degli organi. Queste cellule si differenziano in uno stadio precoce dell'ontogenesi dell'organo cui sono associate con un rallentamento e blocco dello sviluppo, diversamente dalle vicine cellule vacuolate che continuano ad espandersi e maturare. Una volta avvenuto il differenziamento, le cellule sono in grado di rispondere a stimoli appropriati. In semenzali di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*), ad esempio, l'etilene può indurre il distacco di foglioline dal peduncolo e del peduncolo dal fusto (Roberts et al., 2000).

Per definire l'anatomia delle zone di abscissione e la modalità con cui si differenziano sono stati usati diversi sistemi modello. In *Phaseolus vulgaris* sono presenti due zone di separazione a livello del peduncolo della foglia: una alla giunzione tra peduncolo e fusto e l'altra, tra peduncolo e pulvino, che consiste di un singolo strato di cellule e risulta già differenziata prima della completa espansione della lamina fogliare. Un altro modello, che si presta particolarmente a studi di questo genere, è il *Sambucus nigra*. La dimensione delle zone di abscissione di questa pianta, comprendenti circa 20-30 strati di cellule, facilita l'estrazione di acidi nucleici e le analisi enzimatiche. L'unico svantaggio nello studio di tale specie è la mancanza di sistemi efficienti per la trasformazione (Roberts et al., 2000).

Altre specie interessanti per lo studio dell'abscissione sono pomodoro (Roberts, 1984; Taylor, 1990) e *Arabidopsis* (Bleecker and Patterson, 1997), soprattutto per quanto riguarda l'abscissione di foglie e frutti (pomodoro) e degli organi fiorali (*Arabidopsis*).

La zona di abscissione in molte di queste specie è morfologicamente riconoscibile. Generalmente è situata nella giunzione tra organo e corpo della pianta e comprende vari strati di piccole cellule isodiametriche e con citoplasma denso. Tali cellule sono già determinate in uno stadio precoce dello sviluppo dell'organo a cui sono associate e vanno incontro ad una serie di cambiamenti morfologici dipendenti dalla loro posizione o dalla fase in cui l'organo deve abscindere. Queste cellule, dette *target cells*, hanno una competenza predeterminata a rispondere in maniera specifica a segnali ormonali. Esistono tre tipi diversi di *target cells* classificate in base alla diversa risposta ad etilene ed auxine. Le cellule di tipo I sono caratterizzate da un allungamento elevato in presenza di auxina, quelle di tipo II necessitano di etilene per la stimolazione della crescita per distensione, mentre le cellule di tipo III, trovate principalmente in steli e piccioli di piante acquatiche o adattate ad ambienti umidi, sono caratterizzate da una crescita per distensione stimolata indipendentemente da auxina o etilene (Osborne, 1977) (McManus, 2007; Osborne, 2005).

Le *target cells* delle zone di abscissione sono di tipo II nonostante sia stato dimostrato che l'AZ è formata anche da tipi cellulari con caratteristiche diverse (Roberts et al., 2000). Le cellule che formano la zona sono state ampiamente caratterizzate in termini di risposta a stimoli ormonali quali la presenza di etilene e auxina. In particolare, dopo il differenziamento della zona di abscissione, l'auxina in una fase precoce può ritardare l'attivazione della zona, mentre in una fase più avanzata può accelerarla (Addicott, 1970).

Le *target cells* mostrano un citoplasma dall'aspetto molto attivo, particolarmente all'inizio della separazione cellulare. Si è rilevato, infatti, un consistente aumento del reticolo endoplasmatico rugoso (REr) associato con la membrana plasmatica e l'apparato di Golgi, e un accumulo di microcorpi e invaginazioni della membrana plasmatica, molto probabilmente attribuibili al coinvolgimento di endomembrane nella secrezione di enzimi litici della parete. Si assiste inoltre ad un irregolare riarrangiamento delle microfibrille di cellulosa e a una diminuzione dei livelli di calcio, con la conseguente solubilizzazione delle pectine. Già verso la fine della cosiddetta *lag phase* che precede la fase di separazione vera e propria, avvengono cambiamenti nell'espressione di pectin metil-esterasi e pectato-liasi che si pensa siano coinvolte nella demetilazione della pectina durante la demolizione della lamella mediana, e di altre idrolasi di parete come glucanasi, xiloglucano idrolasi e poligalatturonasi, oltre che ad una più intensa attività respiratoria (Patterson, 2001). Durante la fase di separazione le cellule di AZ nella parte distale o prossimale subiscono una progressiva distensione che potrebbe avere un ruolo nella generazione di forze meccaniche atte a rompere i fasci xilematici (Roberts et al., 2002). Lo xilema e la cuticola non sono affetti dall'attività idrolasica, ma la separazione avviene ugualmente, infatti al microscopio elettronico è possibile osservare i fasci xilematici che fuoriescono dalla superficie di rottura. È stato dimostrato che l'etilene promuove la crescita specifica delle cellule nella zona di abscissione, ma non delle cellule vicine. Ad esempio in *Impatiens sultani* le cellule del parenchima corticale si espandono durante il processo di abscissione,

generando delle forze longitudinali atte a rompere la cuticola e lo xilema (Brown, 1997).

Recentemente, allo scopo di rivelare eventi morfogenetici alla base del differenziamento della zona di abscissione, sono stati isolati e caratterizzati mutanti di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) incapaci di abscindere o con abscissione ritardata. Ad esempio, una mutazione in corrispondenza del gene LATERAL SUPPRESSOR (*LS*) blocca il differenziamento della zona di abscissione del peduncolo del fiore di pomodoro. Tale gene codifica per un membro della famiglia delle proteine VHIID, che presumibilmente agiscono come attivatori della trascrizione. Sebbene la funzione dei membri di questa famiglia resti tuttora materia di dibattito, è probabile che tali proteine siano coinvolte nei meccanismi di percezione e trasduzione del segnale indotto da gibberelline, sulla base del fatto che presentano omologie con GAI, RGA, Rht-1 e d8. Ciò suggerisce che anche LS possa regolare la sensibilità alle gibberelline nel sito di formazione della zona di abscissione (Roberts et al., 2000). Un mutante *jointless*, gene codificante per un fattore MADS-box, è incapace di differenziare la zona di abscissione in corrispondenza del peduncolo del fiore, diversamente dagli individui *wild-type* che la sviluppano alla metà del peduncolo (Szymkowiak and Irish, 1999). L'azione di JOINTLESS non è tuttavia sufficiente a stabilire il sito specifico dove si differenzierà la zona di separazione, l'ipotesi più accreditata è che la sua funzione sia solo quella di stabilire se si formerà o meno tale zona (Mao et al., 2000). Vari altri membri della famiglia dei fattori di trascrizione MADS-box sono implicati nel processo di differenziamento cellulare della zona di abscissione. Fondamentale, per esempio, è il ruolo sinergico di SHATTERPROOF1 e 2 nella formazione della zona di deiscenza nelle silique di *Arabidopsis*. Il doppio mutante (*shp1 shp2*) è incapace di differenziare la zona di deiscenza ed indurre la lignificazione delle cellule adiacenti (Roberts et al., 2002).

1.3.2 Cambiamenti Nell'espressione Genica

L'abscissione culmina con il distacco dell'organo dalla pianta madre, per questo molti studi si sono concentrati sulla caratterizzazione degli enzimi coinvolti nella degradazione della parete, benché anche vari altri fattori, come cambiamenti del pH o nella concentrazione di Ca^{2+} , possano contribuire al processo (Gonzalez-Carranza et al., 1998).

Il primo gene coinvolto nella degradazione della parete, ad essere clonato codifica per una β -1,4-glucanasi ed è stato isolato nella zona di abscissione di peduncolo di foglie di *P. vulgaris*. Si tratta di una cellulasi attiva durante l'abscissione non solo di foglie, ma anche di fiori e frutti. L'espressione dell'enzima è per lo più ristretta alla zona di abscissione, nonostante in *P. vulgaris* si registri un'aumentata attività anche in corrispondenza delle regioni adiacenti che non vanno incontro a separazione, inoltre è indotta da trattamenti con etilene e repressa da acido indol-acetico. Il gene codificante per la β -1,4-glucanasi appartiene ad una grande famiglia multigenica; in pomodoro sono stati clonati sette diversi isoenzimi (Cel1-Cel7), dei quali tre (Cel1, Cel2 e Cel5) sono risultati maggiormente espressi nella fase di separazione cellulare che precede l'abscissione dei fiori di pomodoro. Silenziando Cel1 e Cel2 in piante di pomodoro con costrutti antisense è stato dimostrato che, affinché l'abscissione del fiore proceda ugualmente, sono necessarie, nella fase di separazione, forze meccaniche maggiori rispetto al *wild-type*. Sebbene entrambi i geni risultino essere sovraespressi anche nel frutto durante la fase di maturazione, il loro silenziamento in questa fase dello sviluppo non comporta rallentamenti nel processo di abscissione, a dimostrazione del fatto che la separazione cellulare specifica della maturazione coinvolge geni diversi rispetto all'abscissione (Roberts et al., 2002). Altri enzimi, il cui ruolo nei processi di separazione cellulare è chiaramente riconosciuto, sono le poligalatturonasi (PG), anch'esse appartenenti ad una famiglia multigenica e responsabili della demolizione della pectina, che rappresenta il costituente fondamentale della lamella mediana.

Anche in questo caso è stato dimostrato che le PG associate all'abscissione sono specifiche per tale processo e si differenziano da quelle coinvolte in altri

fenomeni legati allo sviluppo che richiedono l'indebolimento della parete cellulare, come la maturazione del frutto (Taylor and Whitelaw, 2001). Tre isoforme di PG (TAPG1, TAPG2 e TAPG4) sono associate all'abscissione in pomodoro e sono altamente omologhe tra di loro (80-90% di similarità nucleotidica), ma i loro trascritti sono più brevi rispetto a quelli delle PG del frutto con cui hanno un 50% di similarità. Inoltre TAPG2 e TAPG4 si accumulano nella zona del peduncolo prima dell'inizio della separazione cellulare, mentre TAPG1 si ritrova solo 6 ore dopo il distacco dell'organo e l'espressione è indotta dall'etilene e inibita dalle auxine (Roberts et al., 2002). Per analizzare l'espressione temporale e spaziale è stato utilizzato un costrutto con un gene reporter β -glucuronidasi (GUS) ed è stato verificato che l'espressione delle poligalatturonasi si localizza all'interno della zona di abscissione dei peduncoli di foglie, fiori e frutti. Più nello specifico l'espressione di TAPG1 si localizza nelle zone di abscissione di foglie e fiori, mentre l'espressione di TAPG4 si localizza per lo più in corrispondenza dei tessuti vascolari (Hong et al., 2000). Questo aspetto avvalorava l'ipotesi secondo cui per dare inizio agli eventi di separazione cellulare sia necessario un segnale diffusibile e direzionato che potrebbe essere costituito da un oligosaccaride derivante dalla degradazione della parete (Thompson and Osborne, 1994). Dunque l'attività poligalatturonasica di TAPG4 nei tessuti vascolari darebbe origine a delle molecole segnale, come oligosaccaridi di parete, che indurrebbero l'espressione di TAPG1 nella zona di separazione. Inoltre, costrutti chimerici di *jointless* e *wild-type* in pomodoro avvalorano l'ipotesi secondo cui il punto iniziale dove le cellule iniziano ad espandersi avviene nelle vicinanze dei fasci vascolari. Ciò potrebbe accreditare la teoria secondo cui la prima cellula a rispondere al segnale di abscissione sia situata vicino ai tessuti vascolari (Taylor and Whitelaw, 2001).

Un'altra classe di enzimi coinvolti nel processo di degradazione della parete sono le espansine. La loro azione è già stata ben documentata nei processi di crescita e di maturazione legati alla distensione parietale (Roberts et al., 2000). Recentemente studi su *S. nigra* hanno evidenziato un aumento dell'espressione di questi enzimi in corrispondenza delle zone di abscissione di tessuti fogliari che

stavano andando incontro a separazione cellulare, mentre nei tessuti adiacenti non-abscindenti i livelli restavano bassi. Successivamente due diversi cDNA sono stati clonati e denominati *SniExp2* e *SniExp4*. Tramite le analisi northern è stato verificato che l'espressione di entrambi i geni è localizzata principalmente in corrispondenza delle zone di abscissione dei tessuti trattati con etilene, mentre non viene evidenziata espressione negli espianti non trattati o nei tessuti non abscindenti. Tale dato avvalorava l'ipotesi secondo cui le espansine sono coinvolte nell'abscissione stimolata dall'etilene e più in generale nei processi di separazione cellulare (Belfield et al., 2005). Allo stato attuale numerose prove sperimentali hanno chiarito quali sono le attività idrolitiche e le specifiche classi di enzimi coinvolte nella perdita di struttura parietale. Resta ancora da accertare quali isoforme di tali enzimi agiscano nello specifico e quali siano i fattori che ne regolano la trascrizione (Roberts et al., 2002).

Il distacco dell'organo rappresenta un potenziale sito di entrata per eventuali patogeni, dunque non è sorprendente il fatto che venga indotta l'espressione di proteine PR (*Pathogenesis-Related*) in associazione con il processo di separazione (Roberts et al., 2002). Durante l'abscissione di foglie di *Phaseolus vulgaris* trattate con etilene sono state ritrovate sei proteine PR comprendenti due isoforme di β -1,3-glucanasi e isoforme multiple di chitinasi i cui trascritti si accumulano per lo più nel momento in cui l'organo si distacca. Ulteriori testimonianze della presenza di proteine PR durante l'abscissione derivano da studi effettuati su tabacco.

L'espressione di GUS, fuso con il promotore di un gene PR-1, si localizza nella zona di abscissione del peduncolo del fiore e alla base della foglia (Gonzalez-Carranza et al., 1998). È stata, inoltre, individuata una proteina simile ad una metallotioneina che si accumula specificatamente nelle zone di abscissione di foglie di *Sambucus nigra*. La funzione di queste proteine resta ancora da chiarire, ma secondo l'ipotesi più accreditata esse sono coinvolte nel proteggere le cellule dai radicali liberi associati con l'induzione dell'espressione di proteine PR. Le metallotioneine sono stimulate dall'etilene e coinvolte anche nei processi di senescenza e di maturazione del frutto. Altrettanto documentati sono le variazioni

nell'espressione di perossidasi, che presumibilmente svolgono la loro azione ossidativa nei confronti delle auxine, responsabili di ritardare la sindrome (Gonzalez-Carranza et al., 1998).

Sebbene si abbiano numerose informazioni relativamente agli enzimi idrolitici e al controllo ormonale dell'abscissione, i meccanismi di regolazione alla base della sindrome restano ancora per gran parte sconosciuti.

1.3.3 Abscissione In Arabidopsis

Uno dei contributi più significativi per la comprensione del fenomeno dell'abscissione riguarda l'identificazione e la caratterizzazione, in una pianta modello come *Arabidopsis*, di mutanti con abscissione ritardata o assente allo scopo di classificare i possibili geni coinvolti nel processo. Mentre molti di questi mutanti codificano per prodotti nuovi o tuttora sconosciuti, altri possono essere raggruppati in diverse classi che includono mutanti affetti da una risposta agli ormoni disturbata o assente, altri con mutazioni che interessano le vie di risposta ai patogeni o vie relative al metabolismo della parete cellulare e mutanti associati a MADS-box.

Nell'ecotipo Columbia di *Arabidopsis*, petali, stami e sepali si separano dal ricettacolo alla posizione numero 6-8 (Figura 1.1, Figura 1.2). Gli ecotipi Wassilewskija (WS) e Landsberg erecta mostrano un pattern di abscissione molto simile, con una perdita degli organi in posizione 7 e 6 rispettivamente (Figura 1.1).

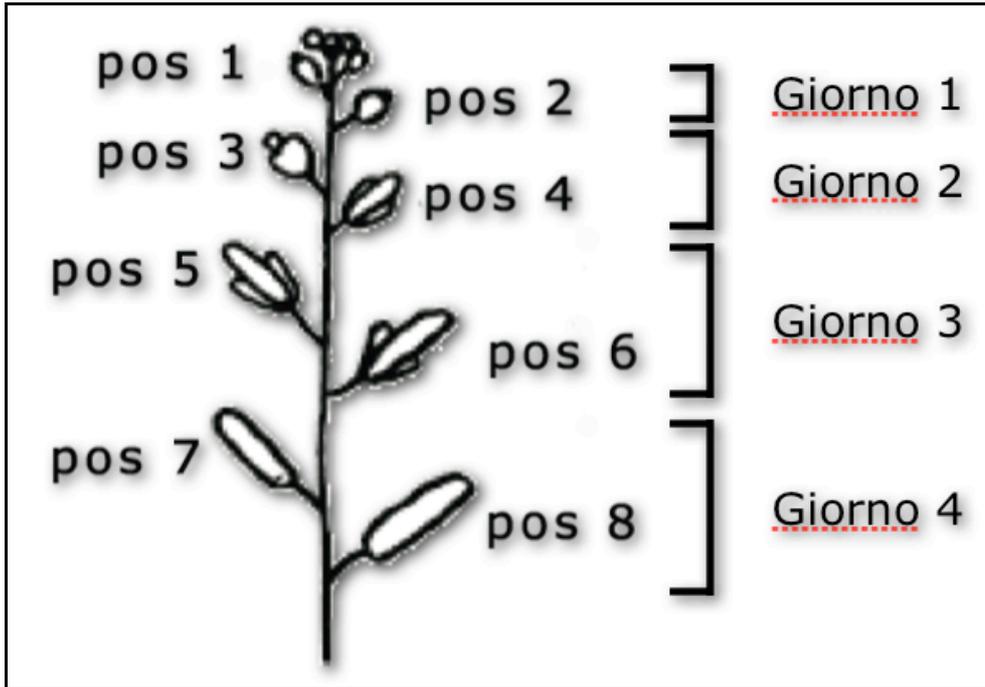


Figura 1.1: numerazione dei fiori sullo stelo di *Arabidopsis* a partire dall'apice. La numerazione parte dalla posizione 1, che corrisponde al fiore chiuso in cui si vedono i petali, si procede poi in direzione basipeta a numerare i fiori inseriti nelle diverse posizioni e contraddistinti sulla base dell'epoca di fioritura. Al primo giorno di fioritura si sviluppano le posizioni 1 e 2, al secondo giorno le posizioni 3 e 4 e così via (da (Patterson, 2001)).

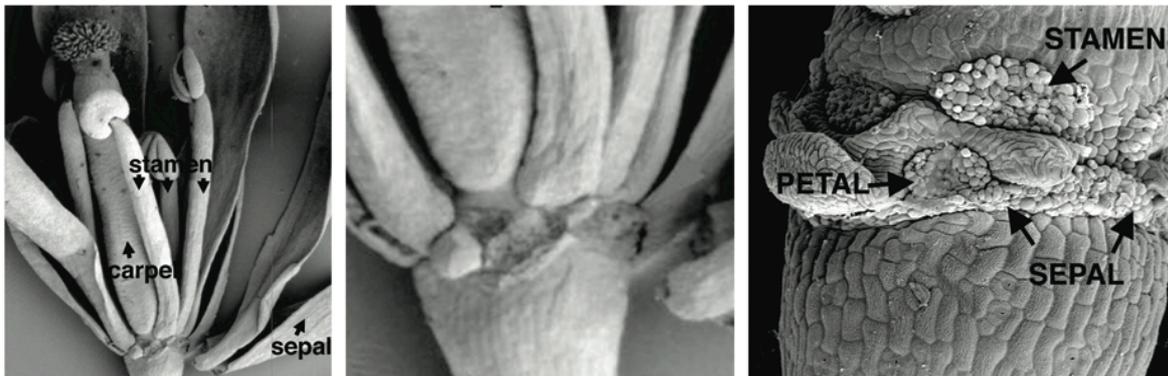


Figura 1.2: immagini al microscopio elettronico della struttura del fiore di *Arabidopsis* (a sinistra) con un particolare della zona di abscissione (al centro). Zona di abscissione florale osservata al microscopio elettronico a scansione ad abscissione già avvenuta (a destra), caratterizzata da cellule che presentano l'aspetto di protoplasti (da(Patterson, 2001)).

Alcuni mutanti di *Arabidopsis* degni di nota per quanto riguarda l'abscissione ritardata sono *etr1-1*, con abscissione in posizione 10-11, e la linea con la sovraespressione di 35S::AGL-15 (AGAMOUS LIKE 15) che ha un'abscissione ritardata oltre la posizione 20. Un altro mutante con abscissione ritardata o assente è *HAESA*, codificante per una chinasi "receptor-like" (RLK) del tipo LRR (*leucine rich-repeat*), che risulta essere una componente essenziale per l'abscissione degli organi fiorali di *Arabidopsis*. Dall'analisi di piante contenenti il costrutto HAESA::GUS si è visto che questa serin-treonin-chinasi di membrana si esprime nelle AZ dove sepali, petali e stami si congiungono col ricettacolo e nella zona di abscissione alla base del picciolo fogliare (Jinn et al., 2000). L'analisi di piante transgeniche in cui HAESA viene silenziato con un costrutto antisenso ha definito il ruolo fondamentale di tale chinasi nell'abscissione di strutture fiorali in *Arabidopsis*. Nei trasformanti infatti si assiste ad un ritardo dell'abscissione degli organi fiorali e la severità del fenotipo è direttamente correlata con il livello di proteina. Le piante con un'alta espressione dell'antisenso hanno mostrato una completa assenza di abscissione.

Recentemente è stato isolato in *Arabidopsis* un mutante, denominato *ida* (*inflorescence deficient in abscission*), peculiare rispetto agli altri mutanti finora descritti, in quanto l'abscissione degli organi fiorali non viene mai evocata, nemmeno con l'applicazione di etilene esogeno, nonostante la capacità di percepire l'etilene non sia compromessa dalla mutazione (Butenko et al., 2003). La mutazione non pregiudica né il differenziamento della zona di abscissione, né l'acquisizione della competenza a rispondere da parte delle cellule di AZ, né la capacità di espansione cellulare che accompagna la fase di separazione; ma probabilmente interferisce nella fase finale di separazione cellulare. IDA codifica per un peptide secreto di 77 amminoacidi con le caratteristiche tipiche dei ligandi ed è probabile che agisca come effettore positivo nella regolazione genica alla base del processo di separazione cellulare ed interagisca con un recettore LRR-RLK HAESA anch'esso coinvolto nell'abscissione degli organi fiorali in *Arabidopsis*. Piante con il costrutto IDAp::GUS hanno evidenziato l'espressione genica di IDA specificamente nelle zone di abscissione fiorali (Butenko et al., 2003), benché una sovraespressione del

gene dia la competenza ad abscindere (senza alcun trattamento con etilene) alle zone di abscissione vestigiali alla base di peduncoli, di infiorescenze e foglie caulinari (Stenvik et al., 2006). I mutanti *ida* hanno una normale differenziazione delle zone di abscissione fiorali, suggerendo che il peptide non giochi un ruolo nella differenziazione della zona di abscissione, ma piuttosto che un accumulo del peptide agisca come un indicatore per la competenza cellulare (McManus, 2007). Inoltre, pur avendo abscissione inibita o ritardata, i mutanti di *Arabidopsis ida* (Butenko et al., 2003) e piante transgeniche con il gene *HAESA* sottoespresso (Jinn et al., 2000), non mostrano percezione alterata dell'etilene.

Un altro mutante con caratteristiche simili a *ida* è stato isolato in *Lupinus angustifolius*, ed è stato denominato *abs1*. Anche in questo caso, le piante di lupino non vanno incontro ad abscissione delle foglie, nemmeno nel caso in cui venga applicato etilene esogeno o sia stimolata la produzione di etilene con altri sistemi. Si tratta quindi di una mutazione che non riguarda il sistema di percezione dell'etilene, ma che presumibilmente comporta un'incapacità o un ritardo dell'attivazione degli enzimi idrolitici (Clements and Atkins, 2001). In ogni caso molti altri studi hanno dimostrato un ruolo dell'etilene nella separazione cellulare, nell'espansione delle cellule prossimali al piano di frattura e nell'induzione degli enzimi idrolitici nella zona di abscissione (Patterson and Bleecker, 2004).

Diversi altri mutanti recentemente caratterizzati sono associati all'abscissione ritardata pur non facendo parte dei gruppi precedentemente descritti. I mutanti *dab1*, *dab2*, *dab3*, *dab4* e *dab5* (*delayed abscission*) mostrano una normale risposta all'etilene, ma comunque una abscissione ritardata. Ognuno di questi ha caratteristiche anatomiche e fisiologiche specifiche, ma nonostante le loro zone di abscissione si differenzino normalmente, la separazione e l'espansione cellulare avvengono in ritardo rispetto al *wild-type*: piante della linea omozigote *dab3-3* presentano abscissione in posizione 16 e piante *dab4-1* e *dab5-1* presentano abscissione in posizione 20-22. Inoltre il confronto dei mutanti *dab* con i mutanti insensibili all'etilene (*etr1* e *ein2*), ha consentito di mettere in evidenza che il ritardo nell'abscissione dei mutanti *dab* è maggiore rispetto a quello dei mutanti *etr1* e *ein2*,

nonostante il fatto che i mutanti *dab* rispondano normalmente a trattamenti con etilene (Patterson and Bleecker, 2004) (Figura 1.3).

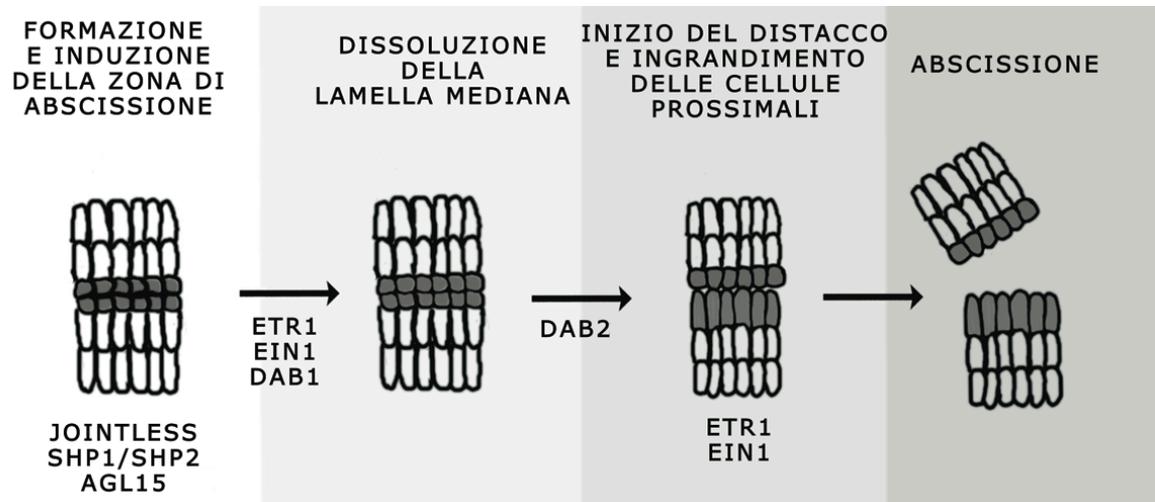


Figura 1.3: cinetica di abscissione in Arabidopsis con, sotto, i geni che si ipotizza siano coinvolti nelle varie fasi del processo (da (Patterson, 2001)).

1.4 ORMONI ED ABSCISSIONE

Indispensabile per il processo di abscissione è che la degradazione della lamella mediana nella zona di separazione avvenga approssimativamente nello stesso momento in tutte le cellule. Ciò implica che specifici fattori di regolazione siano responsabili del coordinamento del fenomeno in un determinato stadio di sviluppo o in particolari condizioni ambientali (Roberts et al., 2000). Gli ormoni svolgono un ruolo fondamentale quali regolatori dell'abscissione. Anche se è possibile che tutti gli ormoni, seppure a livello diverso siano coinvolti nella regolazione sistemica del processo, si ritiene che etilene ed auxine svolgano un ruolo prevalente.

1.4.1 Etilene E Abscissione

E' noto che l'etilene esercita un'azione regolativa fondamentale nell'abscissione. Già negli anni '70 è stato dimostrato che trattamenti con etilene stimolano l'abscissione fogliare in *Prunus serrulata senriko* e *Parthenocissus quinquefolia* (Jackson and Osborne, 1970). Negli ultimi decenni l'azione dell'etilene, quale stimolatore dell'abscissione, è stata dimostrata in varie altre specie vegetali, anche se recentemente è stata dimostrata l'esistenza di pathway etilene-indipendenti (Patterson and Bleecker, 2004).

Arabidopsis thaliana può costituire un sistema modello per lo studio dell'abscissione di organi fiorali, visto che la sindrome in natura non si manifesta per foglie e frutti (Bleecker and Patterson, 1997). L'analisi di mutanti insensibili all'etilene (*etr1-1*, *ein2-1*) ha sollevato numerose controversie relative al ruolo di tale fitormone. Infatti in questi mutanti si assiste ad un ritardo nel manifestarsi dei vari sintomi legati all'abscissione, oltre che una ridotta severità degli stessi, ma il processo si compie ugualmente. Tali evidenze sperimentali non negano all'etilene un ruolo di modulatore della sindrome, ma sollevano dubbi relativamente al fatto che l'ormone sia effettivamente essenziale per l'attivazione dell'abscissione (Patterson and Bleecker, 2004).

Oltre all'influenza degli ormoni, è stato scoperto che alcuni prodotti della degradazione di organi o cellule durante la senescenza sono indispensabili per l'attivazione insieme all'etilene (Thompson and Osborne, 1994). L'etilene quindi, anche se necessario non è sufficiente ad indurre l'attivazione della zona. Recenti studi con *Arabidopsis thaliana* suggeriscono che l'etilene sia un modulatore del processo di abscissione.

L'espressione ectopica di un fattore MADS-box, *AGL15* (*AGAMOUS-like 15*) aumenta la longevità di petali e sepali in *Arabidopsis* (Fernandez et al., 2000). L'ipotesi più accreditata è che *AGL15* espresso costitutivamente interferisca con i processi legati all'acquisizione della competenza ad abscindere dipendente dall'età, per cui le cellule AZ mantengono più a lungo uno stato giovanile. Nelle piante transgeniche, nonostante alcuni processi che influenzano il coordinamento dell'intera sindrome risultino alterati, l'abscissione, seppur ritardata, avviene ugualmente.

L'aspetto interessante è che le cellule dell'AZ che esprimono costitutivamente *AGL15* sono comunque in grado di percepire e rispondere all'applicazione di etilene esogeno. E' dunque presumibile che la pathway in cui è coinvolto *AGL15* e quella regolata dall'etilene siano parallele se non completamente indipendenti (Fernandez et al., 2000).

Più recentemente è stato dimostrato che l'abscissione di frutti di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) è efficacemente bloccata in un mutante *nr1* (*never ripe*), omologo di *ETR1* di *Arabidopsis* e dall'1-MCP (1-metilciclopropene), un competitore dell'etilene e (Giovannoni, 2001; Wilkinson et al., 1997). E' da tenere in considerazione anche il fatto che possono sussistere variazioni nella regolazione della pathway di percezione e trasduzione del segnale etilenico. Ad esempio *CTR1* è espresso costitutivamente in *Arabidopsis*, mentre l'espressione di *LeCTR1*, l'omologo in pomodoro, è regolato da fattori esterni e interni legati allo sviluppo (Stepanova and Alonso, 2005).

Dall'analisi dei mutanti finora descritti è chiaro che non si può conferire esclusivamente all'etilene il ruolo di induttore e regolatore del programma genetico

'abscissione', bensì quello di modulatore del processo (Butenko et al., 2003). Si può quindi affermare che il distacco di un organo dalla pianta madre non sia il frutto di una serie di eventi che avvengono in sequenza lineare, ma dipenda da un complesso controllo multifattoriale. Dunque sono le specifiche condizioni genetiche e fisiologiche, oltre che le diverse capacità di adattamento all'ambiente delle specie, a condizionare l'attivazione o meno di una determinata pathway nella regolazione della sindrome (Brown, 1997).

Queste conclusioni sono rafforzate dall'analisi di mutanti di *Arabidopsis* insensibili all'etilene (*etr1* e *ein2*) che, nonostante non percepiscano il segnale dell'ormone, presentano solo un ritardo dell'abscissione che però avviene comunque.

Sulla base di queste evidenze sperimentali, si è concluso che l'abscissione può essere accelerata dall'etilene in determinate condizioni, ma può avvenire anche indipendentemente da esso (Patterson and Bleecker, 2004). In ogni caso i segnali coinvolti, di natura ormonale e/o diversa, che inducono l'abscissione non sono confinati alla zona stessa, ma sono invece prodotti a valle dell'organo abscidente.

1.4.2 Auxina E Abscissione

L'effetto repressivo dell'auxina, prima della stimolazione della zona con l'etilene, è stato provato in molte specie tra cui *Citrus sinensis* e *P. vulgaris* (Jaffe, 1979; Ratner et al., 1969; Wright and Osborne, 1974). In *S. nigra* in seguito a precoce applicazione di auxina, l'attivazione della zona di abscissione è stata efficacemente ripristinata dopo un trattamento con concentrazione elevata di etilene (Osborne and Sargent, 1976). Queste evidenze indicano chiaramente come le cellule e le strutture delle zone di abscissione necessitano di un differenziamento che renda possibile la successiva induzione dovuta ad un equilibrio di stimoli endogeni, ormonali, ed esogeni, ambientali. In linea generale l'abscissione comporta una diminuzione nella biosintesi e nel trasporto di ormoni che ostacolano il processo come auxine e citochinine, concomitante con un aumento del livello di

etilene e acido abscissico che invece lo accelerano. Dunque la progressione della sindrome risulta fortemente influenzata dall'equilibrio che si genera tra i vari ormoni coinvolti, oltre che dalla sensibilità manifestata dai tessuti nei loro confronti (Taylor and Whitelaw, 2001). Il flusso di auxine nella zona di abscissione influenza la sensibilità all'etilene nella zona stessa. Di conseguenza qualsiasi fattore che induce variazioni nel trasporto o nel metabolismo auxinico può indirettamente essere responsabile anche di una modificazione dei recettori dell'etilene (Taylor and Whitelaw, 2001).

La capacità di percepire e rispondere ad uno specifico stimolo di natura ormonale può essere regolata spazialmente e temporalmente, ed è quello che succede in processi come l'abscissione o la maturazione. Nel caso dell'abscissione avviene infatti che cellule adiacenti siano in grado di rispondere differenzialmente ad uno stesso stimolo ormonale (Klee, 2002). Dunque la regolazione dell'abscissione può non essere direttamente correlata con il tasso di sintesi dell'etilene, ma con la sensibilità espressa, nei tessuti in specifici stadi di sviluppo, nei confronti dell'etilene (Brown, 1997). Anche lo stato fisiologico degli organi è fondamentale nel determinare la capacità di percezione dell'etilene per cui durante lo stadio di invecchiamento, stress biotici e abiotici, in genere aumentano la sensibilità di AZ di foglie, frutti e fiori (Sexton and Roberts, 1982). D'altra parte l'etilene è un potente inibitore del trasporto polare delle auxine e può interferire nel loro metabolismo stimolandone la coniugazione o distruzione (Taylor and Whitelaw, 2001). Trattando solamente la zona o solamente la foglia con etilene non si verifica abscissione, mentre se vengono trattate entrambe contemporaneamente avviene il distacco della foglia (Beyer, 1975). Tale semplice esperimento avvalorava l'ipotesi che l'etilene inibisca soprattutto il flusso di auxine, piuttosto che ridurre la loro sintesi o indurne la deattivazione (Sexton and Roberts, 1982).

L'intervallo di tempo tra induzione dell'abscissione e distacco dell'organo abscidente varia in rapporto al tipo di tessuto e all'abbondanza di fattori che accelerano o ritardano il fenomeno. L'abscissione in termini cinetici comprende una *lag phase* e una fase di separazione in cui si concretizza il distacco dell'organo

(Taylor and Whitelaw, 2001). E' noto il fatto che l'auxina inibisce l'abscissione, contrastando l'azione dell'etilene, solamente in un periodo ristretto, noto come lo stadio I della *lag phase*. In questo intervallo di tempo trattamenti con etilene esogeno non sono sufficienti ed evocare la sindrome. Durante lo stadio II della *lag phase*, mano a mano che il flusso delle auxine si riduce, l'AZ diventa progressivamente più sensibile all'etilene. Trattamenti con etilene o stress di varia natura promuovono l'invecchiamento dell'organo e sono riconosciuti come fattori acceleranti del passaggio dallo stadio I allo stadio II (Brown, 1997). L'acquisizione della competenza ad abscindere è infatti associata con cambiamenti significativi nella biosintesi e nella percezione dell'etilene nei tessuti dell'organo destinato ad abscindere (Lashbrook et al., 1998). L'abscissione, infine, culmina nella fase di separazione cellulare (Brown, 1997).

1.5 CASCOLA FISIOLÓGICA DEI FRUTTICINI IN *Malus domestica*

Le difficoltà incontrate nell'esecuzione del diradamento chimico legate alla variabilità della risposta biologica e alla scarsa riproducibilità dei risultati, pongono la necessità di dover migliorare le conoscenze sulla regolazione del fenomeno della cascola. In quest'ottica il perfezionamento delle tecniche di diradamento può avvenire solamente studiando i principali fattori di variabilità (composti diradanti, epoca di somministrazione, fattori ambientali, caratteristiche intrinseche dell'albero) per stabilire in quale misura questi agiscano sul potenziale di cascola naturale. Attualmente numerose, ma ancora incomplete, sono le conoscenze relative al meccanismo fisiologico con cui la cascola fisiologica si mette in atto e le basi genetiche responsabili del coordinamento del processo. E' noto infatti che l'abscissione è il risultato dell'attivazione di AZ localizzate, nel caso del melo alla base del peduncolo. La cascola fisiologica è la conseguenza di un meccanismo di selezione che si esplica nell'ambito della popolazione di frutticini, risultato di una competizione nutrizionale tra *sink* riproduttivi e vegetativi. Per esempio, nel caso del

melo, in un mazzetto di frutticini, è il frutto centrale a dominare e controllare lo sviluppo dei frutti laterali e a causare l'abscissione della maggior parte di questi. In corrispondenza di AZ il trasporto polare delle auxine da unidirezionale diventa multidirezionale e in questa posizione il trasporto polare dei frutti centrali dominanti depolarizza quello dei frutticini laterali che riducono la loro capacità di attrarre assimilati e accrescersi, e di conseguenza vengono indotti ad abscindere (Bangerth, 2000).

L'abscissione riguarda per lo più i frutticini laterali che sono più piccoli, hanno spesso un minor numero di semi e una minore capacità di produzione di auxina rispetto ai frutti centrali. I rapporti di dominanza dipendono da numerosi fattori come: la differenza in termini di tempo tra lo sviluppo di frutti laterali e di quelli centrali (dominanti), per cui quanto più ampio è questo intervallo, maggiore è la disparità nella competizione per gli assimilati; il numero di frutticini nel mazzetto, che in genere se elevato amplifica il potenziale di cascola; la vicinanza ad un germoglio che costituisce un ulteriore *sink* metabolico (Figura 1.4) (Bangerth, 2000).

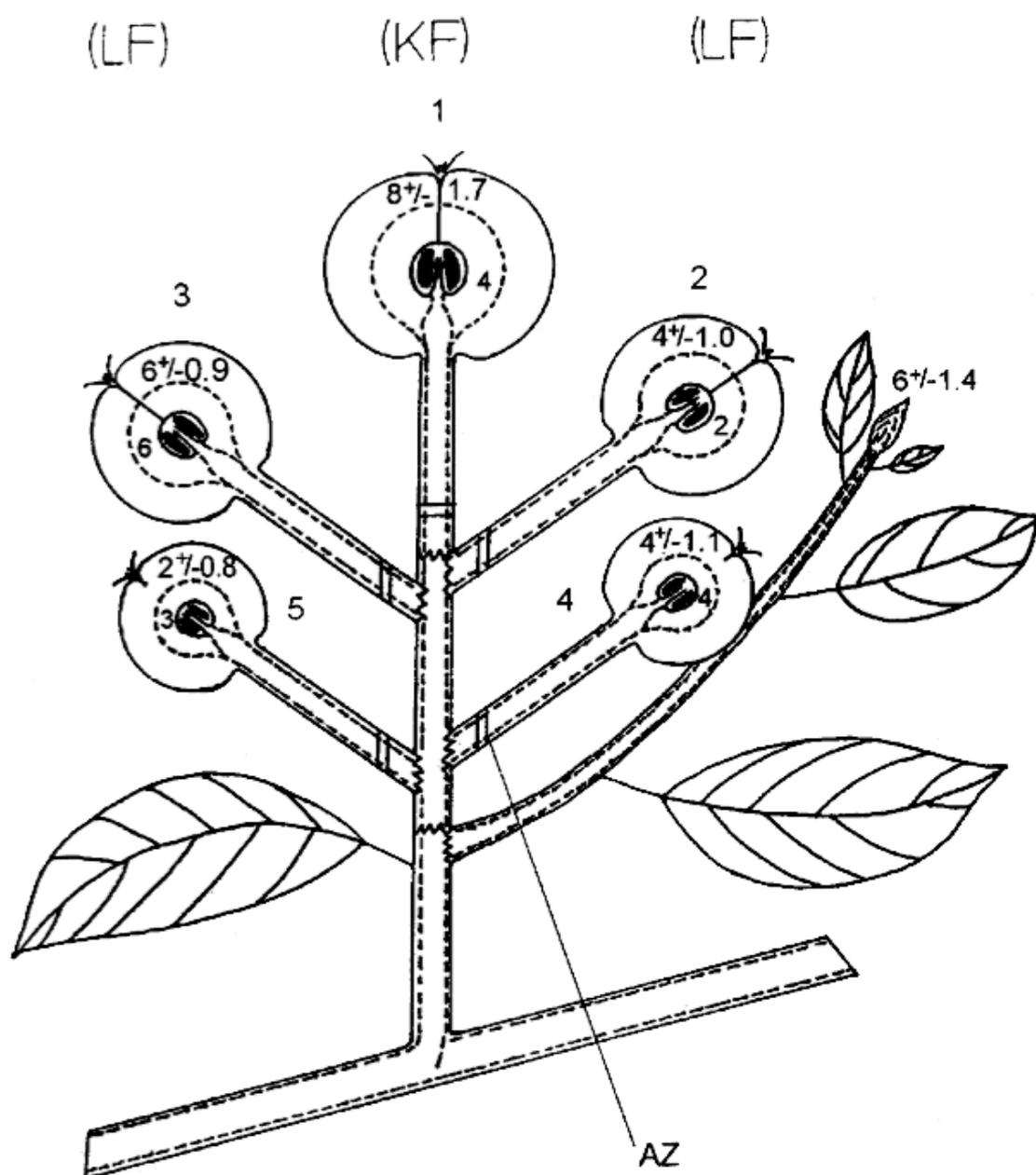


Figura 1.4: Schema di un mazzetto di frutticini in melo. I numeri fuori dai frutti rappresentano la gerarchia dei frutti. I numeri all'interno dei frutti rappresentano la quantità di IAA esportato in ng per 20h \pm errore standard e, come esempio, il numero di semi all'interno del frutto. La cultivar rappresentata è Jonagold dopo 25 giorni dalla piena fioritura (Da (Bangerth, 2000)).
 ----: canali di trasporto polare dell'IAA.
 ~~~: posizione in cui avviene l'autoinibizione del trasporto dell'IAA.

L'abscissione dei frutticini avviene con meccanismi di regolazione specifici, ma per certi versi simili a tessuti che vanno incontro a senescenza o maturazione. Lo studio delle basi genetiche nell'abscissione è stato inizialmente focalizzato sull'identificazione degli enzimi idrolitici coinvolti nel processo di degradazione della parete, e numerose sono state le informazioni raccolte a questo riguardo. Questi studi hanno confermato l'induzione di varie isoforme di enzimi idrolitici con attività cellulastica e poligalatturonasica in corrispondenza della zona di separazione di frutticini di melo (Pandita and Jindal, 1991) e pesco (Bonghi et al., 1992; Ruperti et al., 1998; Trainotti et al., 1997) stimolati dall'applicazione di etilene esogeno. Inoltre spesso è stato rilevato che mutazioni in corrispondenza dei geni codificanti per questi enzimi non pregiudichino l'andamento generale della sindrome. Resta infatti ancora da stabilire quali specifiche isoforme degli enzimi prendano parte alle fasi di separazione cellulare durante l'abscissione.

Per quanto riguarda il coinvolgimento dell'etilene, è stato dimostrato che l'attività di 1-aminociclopropano-1-carbossilato ossidasi (ACO), enzima coinvolto nell'ultimo passaggio della biosintesi dell'ormone, e la quantità dei relativi trascritti aumentano in concomitanza con il picco etilenico che precede la cascola di frutticini di pesco (*Prunus persica*) trattati con propilene (Ruperti et al., 1998). Inoltre è stato osservato un gradiente decrescente, in termini di produzione di etilene, di attività di ACO e di accumulo degli mRNA relativi, dalla non-zona distale (DNZ, pericarpo) a quella prossimale (PNZ, peduncolo) attraverso l'AZ. L'accumulo di 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) avveniva invece solamente dopo 12h dal trattamento con propilene e nello stesso intervallo di tempo non è stata riscontrata nessuna variazione nella quantità dei trascritti di ACC sintasi (ACS). Tali risultati avvalorano l'ipotesi secondo cui ACO sia coinvolto nella regolazione della biosintesi dell'etilene primariamente nelle fasi iniziali della cascola (Ruperti et al., 1998). In ogni caso è presumibile che anche ACS sia implicato nella regolazione della biosintesi, dal momento che trattamenti con un suo inibitore (AVG) bloccano la cascola dei frutticini (Ramina, 1989). È stato osservato un picco nei livelli di etilene, precedente all'evento di cascola, anche in varie altre specie compreso il

melo (Bonghi et al., 2000; Dal Cin et al., 2005a). Anche in quest'ultimo caso è stato dimostrato che l'abscissione dei frutticini (*Malus domestica* cv Golden Delicious) con elevato potenziale di cascola è preceduta da un aumento considerevole nella biosintesi di etilene. È stato registrato inoltre un accumulo generale dei trascritti degli enzimi biosintetici nei tessuti analizzati (cortex, seme, peduncolo e AZ) in particolare di *MdACO*, che si mantengono elevati anche dopo che il picco etilenico si è esaurito; mentre *ACS* si mantiene sempre a livelli più bassi. Similmente allo studio precedentemente descritto, sembra che *ACS* abbia un ruolo centrale nella biosintesi di etilene e che, probabilmente, gli enzimi della pathway biosintetica siano sottoposti ad un controllo post-trascrizionale (Dal Cin et al., 2005a). Nello stesso studio è stata analizzata l'espressione di alcuni recettori dell'etilene nei diversi tessuti presi in considerazione. La stimolazione della biosintesi di etilene, infatti, avviene in parallelo con variazioni nella concentrazione dei suoi recettori. Dal confronto tra due popolazioni di frutti di melo con potenziali di abscissione notevolmente diversi è stato evidenziato che *MdETR1*, *MdERS1* e *MdCTR1* sono differenzialmente espressi a seconda del tipo di tessuto e della popolazione esaminata. È stato osservato poi che l'espressione di *MdETR1* si mantiene sostanzialmente a livelli basali in tutti i tessuti analizzati in entrambe le popolazioni. Inoltre è noto che la stimolazione dell'espressione di *ERS* o il rapporto tra la concentrazione di recettori del tipo *ERS* e quella di recettori di tipo *ETR* possono essere fattori determinanti nel controllo della sensibilità all'etilene. In effetti nella popolazione con elevato potenziale abscindente è stato registrato un incremento consistente nei livelli di *MdERS1* sette giorni dopo il trattamento con BA e un aumento del rapporto delle concentrazioni dei trascritti di *ERS* e *ETR*, che fanno presupporre un ruolo fondamentale per *MdERS1* nella ricezione e trasduzione del segnale etilenico durante l'abscissione. Un altro aspetto cruciale nella regolazione della sensibilità all'etilene è il rapporto tra *CTR1*, il primo elemento della catena trasduttiva e i recettori *ETR* e *ERS*. *CTR1*, in assenza di etilene, blocca la catena trasduttiva. In presenza di etilene esso viene inattivato e ha inizio la cascata fosforilativa. Il livello di espressione di *MdCTR1* è generalmente più basso rispetto a

quello di *MdETR1*. Inoltre è stato osservato un aumento nella concentrazione di *MdCTR1* in corrispondenza di semi e AZ, e una diminuzione a livello di peduncolo e cortex nella popolazione con elevato potenziale di abscissione (Dal Cin et al., 2005a). La regolazione dell'espressione dei recettori etilenici è stata analizzata in vari altri studi. In pesco (*Prunus persica*) sono stati isolati e caratterizzati due recettori omologhi ad *ETR* e *ERS* di *Arabidopsis*: *Pp-ETR1* e *Pp-ERS1* (Rasori et al., 2002). In questo caso è stato dimostrato che il livello dei trascritti di *Pp-ETR1* resta pressoché costante in tutti i tessuti e gli stadi di sviluppo analizzati, mentre i trascritti di *Pp-ERS1* si accumulano nelle AZ di foglie e frutti dopo il trattamento con propilene. Il fatto che *Pp-ERS1* sia fondamentale nel processo di abscissione e che la sua espressione sia tessuto specifica e regolata dall'etilene e dallo sviluppo, è ulteriormente confermato dal blocco dell'abscissione e dall'inibizione dell'espressione di *Pp-ERS1* in seguito al trattamento con 1-MCP (Rasori et al., 2002).

Nonostante l'approccio molecolare abbia permesso di ampliare le conoscenze relativamente ai meccanismi responsabili dell'attivazione di AZ e alla fase di distacco degli organi, restano ancora frammentarie le informazioni sulla biosintesi dell'etilene, sulla sua percezione e trasduzione prima e durante l'abscissione e relativamente alla sua azione in corrispondenza della zona di separazione. Molti di questi quesiti potrebbero probabilmente trovare risposta in futuro sfruttando, ad esempio, le ottime potenzialità derivanti dall'analisi di mutanti di *Arabidopsis* prendendo in considerazione in modo specifico l'abscissione. Dunque una miglior caratterizzazione degli enzimi idrolitici che cooperano nel disassemblamento della parete, l'identificazione di geni per la biosintesi e la percezione dell'etilene operanti nella fase di attivazione di AZ, oltre che l'individuazione e la caratterizzazione di geni associati all'abscissione potranno chiarire progressivamente i meccanismi alla base del processo. Vista la crescente necessità di migliorare le tecniche di diradamento e di ottenere una maggiore riproducibilità di risultati in frutticoltura, una conoscenza più approfondita delle basi genetiche del processo potrebbe infatti costituire la premessa per mettere a punto strategie efficaci per il controllo della

fruttificazione. L'identificazione sistematica-massiva di geni o pool genici direttamente coinvolti nella sindrome consentirebbe di avviare interventi mirati a limitare i fattori di variabilità che impediscono l'ottenimento di risultati ottimali e riproducibili nel diradamento chimico. Inoltre, un'interessante applicazione biotecnologica potrebbe essere rappresentata dalla possibilità di creare piante trasgeniche autodiradanti che limiterebbero al minimo l'impiego di bioregolatori. Purtroppo questo genere di applicazione trova numerosi ostacoli dal momento che l'abscissione è un processo in cui molteplici fattori interagiscono e cooperano e in cui la maggior parte dei geni implicati appartengono a famiglie multigeniche.

## **1.6 APPROCCIO MASSIVO NELLO STUDIO DELL'ABSCISSIONE**

Molti studi sull'abscissione, come su altri processi biologici, sono puntuali e generalmente concentrati su un numero ristretto di geni o proteine. I risultati ottenuti descrivono peculiarità del processo che devono poi essere inserite in un quadro generale più vasto. Per questo motivo è utile avere una visione più ampia analizzando una grande quantità di geni differenzialmente espressi.

Un approccio molecolare massivo allo studio dell'abscissione è utile per individuare i geni coinvolti, anche indirettamente, nel processo. Per evidenziare tali geni in precedenza sono state usate tecniche di *differential display* (Whitelaw, 1999). Il cDNA-AFLP non è mai stato usato, prima d'ora, per identificare geni differenzialmente espressi durante l'abscissione; la riproducibilità, la sensibilità e la specificità della tecnica sono decisamente superiori al normale *differential display* ed inoltre il cDNA-AFLP permette di individuare anche geni poco espressi.

### **1.6.1 Differential Display**

Una delle procedure sperimentali più note e utilizzate per individuare rapidamente prodotti di trascrizione differenzialmente espressi prende il nome di *Differential Display* (DD) (Liang and Pardee, 1992). Questa tecnica, messa a punto

agli inizi degli anni '90, si basa sullo screening di prodotti, amplificati da cDNA sintetizzati a partire da RNA totale, usando un limitato numero di primer arbitrari in combinazione con primer oligo-dT ancorati. Questo consente di visualizzare prodotti di trascrizione amplificati (TDF, *Transcript Derived Fragment*) e di isolare quelli differenzialmente espressi (DETs, *Differential Expressed Transcripts*) (Luda, 1996). Questa tecnica risulta particolarmente appropriata per valutare, attraverso confronti diretti, la variazione dei trascritti in determinati stadi fisiologici o fenologici della pianta, in particolari tessuti e organi ed in seguito a trattamenti di vario tipo (ad es. ormonali o stress biotici ed abiotici).

Il DD può essere realizzato secondo due differenti approcci, entrambi basati sulla PCR, definiti come DD-RT-PCR e cDNA-AFLP.

Il DD-RT-PCR (*Differential Display reverse transcription PCR*) si basa sull'amplificazione di specifiche sottopopolazioni di mRNA, usando la trascrittasi inversa e la PCR per produrre una popolazione di frammenti di differenti lunghezze. In dettaglio, l'mRNA purificato viene impiegato per sintetizzare molecole di DNA complementare (cDNA) mediante RT (*Reverse Transcription*), utilizzando come innesco delle molecole di oligo-d(T) ancorate (cioè contenenti delle basi selettive), le quali si appaiono con le code dei poli-(A) dei trascritti dando inizio alla retrotrascrizione. Il cDNA ottenuto è successivamente amplificato, in presenza di dATP marcato, utilizzando gli stessi oligo-dT ancorati e un dodecamero arbitrario. Infine, gli amplificati sono separati mediante un gel di poliacrilamide (Liang and Pardee, 1992). Il DD è stato impiegato efficacemente come tecnica per l'individuazione di geni espressi in modo differenziale, tuttavia ha delle limitazioni. Poiché i primer arbitrari vengono usati a basse temperature per ottenere il riconoscimento di un maggior numero di siti, i livelli e la specificità di amplificazione non dipendono solo dalla concentrazione iniziale del cDNA, ma anche dalla qualità dell'appaiamento dei primer al template. Per questi motivi i profili di espressione sono fortemente condizionati sia dalla qualità del template sia dalle condizioni di PCR (Matz and Lukyanov, 1998). Questo comporta la possibilità di avere un numero elevato di falsi positivi (Sompayrac et al., 1995; Sun et al.,

1994), una limitata sensibilità (Bertioli et al., 1995) e difficoltà nella riproducibilità (Zhang et al., 1998). L'utilizzo di primer più lunghi ha ridotto, ma non completamente eliminato, il problema dei falsi positivi (Martin and Pardee, 1999). Modificazioni simili hanno permesso di migliorare la sensibilità della tecnica (Ikonomov and Jacob, 1996) e la riproducibilità (Linskens et al., 1995).

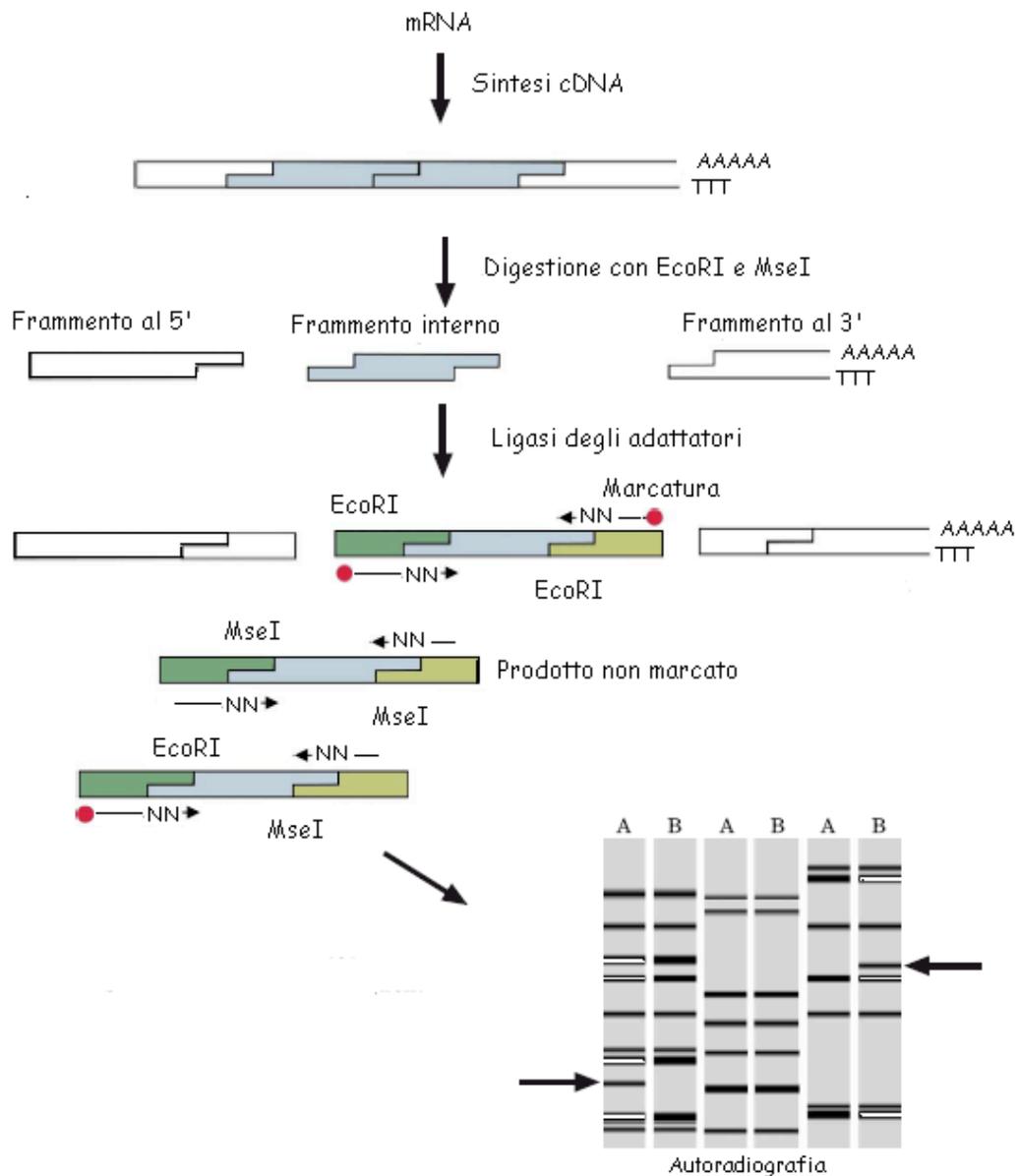
Per ovviare ai problemi del DD è stata messa a punto una tecnica, denominata cDNA AFLP, che utilizza stringenti condizioni di PCR e la ligazione di adattatori al cDNA a doppio filamento dopo la digestione con opportuni enzimi di restrizione (Bachem et al., 1996; Vos et al., 1995). A differenza del DD questa tecnica permette uno studio sistematico del trascrittoma dell'organismo mediante l'amplificazione selettiva dei frammenti. Tre varianti del cDNA AFLP, READS (Prashar and Weissman, 1996), Gene Calling, (Shimkets et al., 1999) e TOGA, (Sutcliffe et al., 2000) sono state utilizzate come metodo sistematico per l'analisi dell'espressione genica.

### **1.6.2 cDNA-AFLP**

La tecnica del *cDNA-Analysis Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP) permette una buona riproducibilità e sensibilità ed anche una buona correlazione con le analisi northern (Bachem et al., 1998; Durrant et al., 2000; Jones et al., 2000). Questa tecnica prevede, dopo la retrotrascrizione dell'mRNA e la sintesi del secondo filamento di cDNA, la digestione del cDNA a doppio filamento mediante una coppia di enzimi di restrizione (un *6-base cutter* come Eco-RI o Pst-I ed un *4-base cutter* come Mse-I o TaqI) e, successivamente, la ligazione di adattatori oligonucleotidici ai frammenti di restrizione così ottenuti. Il cDNA ristretto ligato subisce una prima amplificazione selettiva (pre-amplificazione) con primer complementari alle sequenze dei siti di restrizione e degli adattatori, aventi ciascuno una base selettiva in 3', come nella tecnica AFLP. La bassa complessità del cDNA permette di utilizzare durante l'amplificazione finale, denominata Hot-PCR, due primer aventi due o tre basi selettive, di cui uno marcato in 5' con isotopi radioattivi come <sup>33</sup>P oppure con coloranti fluorescenti. Da un singolo esperimento si ottengono

circa 50-100 bande, per ciascuna coppia di primer utilizzata, che si risolvono in un gel di poliacrilammide (40%). Gli EST (*expressed sequence tag*), individuati attraverso l'analisi della lastra autoradiografica, sono eluiti da gel e successivamente riamplicati e sequenziati (Figura 1.5).

La prima applicazione di questa tecnica nelle piante ha visto il cDNA-AFLP essere usato per analizzare l'espressione genica durante il processo di tuberificazione della patata (Bachem et al., 1996). Successivamente la tecnica è stata utilizzata per confrontare i trascritti presenti in gemme fiorali di due linee distinte di *Ipomea purpurea* (Habu et al., 1997) e quelli presenti in genotipi di medica sensibili e tolleranti al freddo e in riso (Ivashuta et al., 1999). Altri studi di espressione sono stati condotti con successo sia in microrganismi sia in piante ed animali (Donson et al., 2002; Qin et al., 2000; Rizos et al., 2002).



**Fig. 1.5. Schema riassuntivo della tecnica cDNA-AFLP (Ekkehard, 2001). Le frecce indicano esempi di bande di amplificazione relative a geni espressi in modo differenziale .**

## **1.7 SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo della tesi è stato quello di ampliare le conoscenze sugli eventi molecolari associati alla cascola dei frutticini di melo (*Malus domestica*). Con questa finalità, è stato adottato un approccio sistematico-massivo all'analisi dei geni la cui trascrizione varia durante l'abscissione. Per identificare i trascritti di geni espressi in maniera differenziale durante l'induzione dell'abscissione sono state confrontate, con il display differenziale, due popolazioni di frutti denominate frutti abscindenti (AF) e frutti non abscindenti (NAF), caratterizzate da potenziali di abscissione molto differenti (Dal Cin et al., 2005a). Le sequenze ottenute dalle analisi molecolari sono state analizzate e suddivise in *contig* e *singleton* allo scopo di classificarle con i criteri della Gene Ontology per verificare i componenti cellulari, i processi biologici e le funzioni metaboliche maggiormente coinvolti nell'abscissione e per individuare geni candidati per una successiva analisi di espressione. Tramite analisi semiquantitative di espressione sono stati caratterizzati pattern di espressione differenziale per alcuni geni di interesse, in funzione del tempo intercorso dalla stimolazione dell'abscissione e dei diversi tessuti vegetali coinvolti.

Successivamente, mutanti *knockout* di *Arabidopsis thaliana* per alcuni dei geni omologhi a quelli individuati con il cDNA-AFLP in melo sono stati studiati per verificare la presenza di alterazioni dell'abscissione. Inoltre, sono state condotte prove di espressione in mutanti di *Arabidopsis* noti per un fenotipo di abscissione disturbata per evidenziare eventuali alterazioni nell'espressione dei geni individuati precedentemente in melo.



## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 *Malus domestica*

#### 2.1.1 Materiale Vegetale

Gli esperimenti in campo sono stati effettuati su alberi di melo (cv Golden Delicious/M9) presso l'Istituto Agrario Sperimentale di San Michele all'Adige (Trento) nel 2003. Sono state ottenute, su 40 alberi di 7 anni, due popolazioni di frutticini con potenziale di abscissione notevolmente diverso (Dal Cin et al., 2005a). Le due popolazioni di frutticini sono state denominate NAF (frutticini non abscidenti) e AF (frutticini abscidenti). Nella popolazione NAF, in seguito alla caduta dei petali, sono stati eliminati manualmente tutti i frutticini laterali, lasciando solo il centrale. Il fiore centrale è stato impollinato a mano con polline compatibile originando un frutticino con bassissima probabilità di cascolare. Nella popolazione AF i corimbi intatti sono stati trattati con BA (benzilamino purina) 17 giorni dopo la caduta dei petali per accentuare il potenziale di cascola. Tale applicazione è avvenuta trattando gli alberi con Brancher Dirado (BA, 200ppm) quando il diametro dei frutticini era di circa 10-12 mm. La loro dinamica di cascola è stata monitorata per ogni albero lungo tutto il periodo di abscissione (da 14 a 40 giorni dopo la caduta dei petali) e al termine si sono calcolati i livelli di cascola totale per albero. La biosintesi di etilene e' stata monitorata tramite la tecnica fotoacustica come precedentemente descritto (Harren et al., 1990a; Harren et al., 1997; Harren et al., 1990b) sulle due popolazioni di frutticini lungo il periodo di abscissione degli stessi. Il campionamento di semi, cortex e peduncoli è avvenuto in entrambe le popolazioni AF e NAF a 0, 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con la BA (17, 20, 22 e 24 giorni dopo la caduta dei petali), tenendo conto che precedenti ricerche avevano evidenziato che entro 7 giorni dal trattamento con BA avvengono le variazioni trascrizionali più significative. I tessuti prelevati sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per le analisi molecolari.

### 2.1.2 Estrazione Di Rna

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Dal Cin et al. (2005b). Le soluzioni sono state preparate in acqua DEPC, sterilizzata in autoclave e usate a 4 °C.

Una quantità pari a 2 grammi di cortex, 0,5 grammi di peduncoli e 0,5 grammi di semi e' stata macinata finemente in un mortaio, in presenza di azoto liquido. La polvere è stata quindi risospesa in 15 ml di tampone di estrazione preriscaldato a 65 °C composto da: Tris HCl pH9 (100 mM), NaCl (100 mM), EDTA (5 mM),  $\beta$ -mercaptoetanolo (2,5% v/v), PVP (1% p/v), PVPP (1% p/v), acido ascorbico (5 mM). I campioni sono stati incubati a 65 °C per 10 min e agitati vigorosamente ogni 2-3 minuti. In presenza di una soluzione satura di idrossido calcio, i polisaccaridi e altri residui cellulari sono stati pellettati con centrifugazione a 6.000 rpm a 4 °C per 10 min. La soluzione acquosa ottenuta è stata quindi miscelata in successione con un ugual volume di fenolo preriscaldato a 65 °C, una miscela di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25/24/1 v/v) e di cloroformio-alcool isoamilico (24/1 v/v). Le fasi acquose sono state separate da quelle organiche mediante centrifugazione a 11.000 rpm per 10 min a 4 °C. Gli acidi nucleici sono stati precipitati a -80 °C per 1 h, in seguito all'aggiunta di NaOAc pH 4,8 (0,15 M) e un volume di isopropanolo corrispondente a quello della fase acquosa. L'RNA è stato poi pellettato con centrifugazione a 11.000 rpm per 30 min a 4 °C e il pellet ottenuto lavato due volte con 5 ml di ETOH 70% a 4 °C , asciugato, risospeso in 600  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O DEPC e trasferito in un tubo Eppendorf da 1,5 ml. L'RNA totale e' stato fatto precipitare a 4 °C per 16 h in TBE 1X e LiCl 2M. Il pellet ottenuto, dopo una centrifugazione a 14.000 rpm per 30 min a 4 °C, è stato lavato con ETOH 70% a 4 °C, asciugato e risospeso in 100  $\mu$ l di acqua DEPC.

La quantità di RNA totale ottenuta è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer. La concentrazione totale dell'RNA è stata determinata sulla base delle letture di assorbanza secondo la seguente formula:  $(A_{260} - A_{320}) \times (42,5) \times \text{diluizione} / (1000) = \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Per verificare l'assenza di

degradazione e ottimizzare la quantificazione, 1 µg di RNA è stato sottoposto a separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

Una quantità di RNA pari a 30µg per campione è stata quindi trattata con 10U di DNAsi RQ1 priva di Rnasi (Promega, Madison, WI, USA) e 1U di RNAsin (Rnasi inibitore) (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA), purificata con fenolo-cloroformio 3:1, precipitata con un volume corrispondente alla fase acquosa di isopropanolo e NaOAc pH 4.8 (0,15 M), precipitata per un'ora a -80 °C e centrifugata a 14.000 rpm a 4 °C per 30 min. Il pellet ottenuto è stato poi lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in 15 µl di H<sub>2</sub>O DEPC.

### **2.1.3 Analisi cDNA-AFLP**

#### *2.1.3.1 Sintesi del cDNA*

La sintesi del cDNA a doppio filamento a partire da 10 µg di RNA totale, trattato con DNAsi e proveniente da campioni di seme, cortex e peduncolo delle due popolazioni è stata effettuata impiegando il kit Universal RiboClone® cDNA Synthesis System (Promega, Madison, WI, USA) seguendo le indicazioni riportate dal produttore.

#### *2.1.3.2 Restrizione e ligazione*

La restrizione del cDNA e la ligazione agli adattatori (sequenze riportate in tab. 2) sono state condotte contemporaneamente prelevando 10 µl dai 20 µl totali della soluzione precedente (Barcaccia, 2001).

La reazione è stata incubata per 4 h a 37 °C in un volume finale di 30 µl in presenza di tampone 1,25X RL (composizione del tampone RL 5X: 5X OPA one phor all, 25 mM DTT, 250 ng/µl BSA deacetilata), 5 pmol di adattatore EcoRI, 5 pmol di adattatore MseI (Tabella 2.1), ATP (10 mM), 5U di enzima EcoRI, 5U di enzima MseI (New England Biolabs, USA) e 1U di T4 DNA ligasi.

#### 2.1.3.3 Preamplificazione

La preamplificazione è stata condotta su 5 µl del cDNA ristretto e ligato utilizzando i primer Eco (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') e Mse (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') ad una concentrazione finale di 1,5 ng/µl. La reazione è avvenuta impiegando 2U di Taq polimerasi (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA) e corrispettivo tampone (1X) in presenza di dNTP (0,2 mM) e MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM) in un volume finale di 50 µl. Il profilo termico della PCR prevede una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min, seguita da 25 cicli comprendenti: 94 °C per 30 sec, 55 °C per 30 sec e 72 °C per 60 sec e da 7 min a 72 °C.

Per verificare la buona riuscita della reazione di preamplificazione 10 µl sono stati separati elettroforeticamente su gel di agarosio all'1%.

#### 2.1.3.4 Marcatura

La marcatura del primer Eco da impiegare nella successiva amplificazione è stata eseguita usando l'isotopo <sup>33</sup>P. La reazione avviene incubando per 1 h a 37 °C 5 ng di primer Eco e 37 kBq iniziale (0,1 µl) di γ-[<sup>33</sup>P]ATP (Amersham) ad opera di 1U dell'enzima T4 chinasi (Promega) per campione in un volume finale di 30 µl. L'enzima viene infine inattivato a 75 °C per 10 min con EDTA.

#### 2.1.3.5 Amplificazione selettiva

Per l'amplificazione sono stati impiegati 5 µl di una diluizione 1:8 di ogni preamplificato. La reazione è stata condotta con 0,4U di Taq polimerasi (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA), una quantità congrua di primer Eco marcato (generalmente 3,33 µl), 30 ng di primer Mse, dNTP (0,2 mM), tampone PCR (1X), utilizzando le combinazioni di primer riportate in tabella 2.2 in un volume finale di 20 µl.

E' stato utilizzato il seguente profilo termico: uno stadio a 94 °C per 5 min, 94 °C per 45 sec, 65 °C per 30 sec e 72 °C per 1 min seguito da 13 cicli con un abbassamento della temperatura di appaiamento dei primer pari a 0,7 °C/ciclo e da 18 cicli comprendenti 94 °C per 30 sec, 55,9 °C per 30 sec, 72 °C per 1 min, con una fase finale di 72 °C per 5 min. Al termine della PCR è stato aggiunto un ugual volume di colorante FD (98% formammide, EDTA 10 mM , blu di bromofenolo e xilene-cianolo (0,05% p/v).

I campioni sono stati quindi denaturati per 5 min a 98 °C e separati mediante corsa elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide al 5% con urea 8M a 80W di potenza costante tramite l'impiego di un apparecchio BIORAD Sequigen. Al termine della corsa il gel è stato trasferito su foglio di cellulosa (carta 3MM, Whatmann) al quale è stata esposta una lastra autoradiografica (Biomax MR-I film, Kodak).

**Tabella 2.1: sequenze degli adattatori MseI e Eco RI usati negli esperimenti cDNA-AFLP.**

| <b>Adattatore MseI</b>                               | <b>Adattatore EcoRI</b>                                |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 5' - GACGATGAGTCCTGAG -3'<br>3' - TACTCAGGACTCAT -5' | 5' - AATTGGTACGCAGTC -3'<br>3' - CCATGCGTCAGATGCTC -5' |

**Tabella 2.2: combinazioni dei primer usati negli esperimenti cDNA-AFLP con basi selettive.**

| <b>Eco+AC</b> | <b>Eco+CC</b> | <b>Eco+TT</b> | <b>Eco+CT</b> | <b>Eco+AT</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Mse+AGT       | Mse+TCA       | Mse+TCA       | Mse+TCA       | Mse+CTA       |
| Mse+TCA       | Mse+AGT       | Mse+AAG       | Mse+GAA       |               |
| Mse+AAG       | Mse+GAA       | Mse+GAA       | Mse+AGT       |               |
| Mse+AT        | Mse+AAG       | Mse+GC        |               |               |
| Mse+AC        | Mse+GC        | Mse+AT        |               |               |
|               | Mse+AT        | Mse+AC        |               |               |
|               | Mse+AA        |               |               |               |
|               | Mse+AC        |               |               |               |
| <b>Eco+AA</b> | <b>Eco+AG</b> | <b>Eco+GA</b> | <b>Eco+CA</b> | <b>Eco+GG</b> |
| Mse+AAG       | Mse+TCA       | Mse+CTA       | Mse+ACC       | Mse+ACC       |
| Mse+AGT       | Mse+AGT       | Mse+GC        | Mse+CTA       | Mse+CTA       |
| Mse+AT        | Mse+GAA       | Mse+AT        | Mse+CT        | Mse+AT        |
| Mse+GC        | Mse+CTA       | Mse+AA        | Mse+AA        | Mse+GC        |
| Mse+AA        | Mse+AT        | Mse+AC        | Mse+GC        | Mse+AA        |
| Mse+AC        | Mse+AA        |               | Mse+AC        | Mse+AC        |
|               | Mse+AC        |               |               |               |

## 2.1.4 Sequenziamento

### 2.1.4.1 Selezione bande e riamplicazione

Le bande espresse in maniera differenziale di almeno 250 pb, individuate mediante autoradiografia, sono state prelevate dal gel ed eluite per 16 h in 100 µl di acqua sterile. Successivamente 4,5 µl di tale soluzione sono stati riamplicati in presenza di dNTP (0,3 mM), primer Eco (3,1 ng/µl), primer Mse (3,5 ng/µl), 0,5U Taq polimerasi (Amersham) e relativo tampone (1X), utilizzando il seguente profilo termico: 1 stadio a 94 °C per 5 min seguito da 40 cicli comprendenti 94 °C per 30 sec, 50 °C per 30 sec, 72 °C per 1 min e 10 sec e una fase finale a 72 °C per 7 min.

#### 2.1.4.2 Ligazione, Trasformazione, Clonaggio, Sequenziamento

Il prodotto amplificato e purificato è stato subclonato nel plasmide pGEM® T Easy (Promega, Madison, WI, USA) come riportato dal produttore. Le cellule competenti DH5 $\alpha$  sono state trasformate mediante elettroporazione (elettroporatore Biorad), e piastrate su terreno di coltura selettivo per il gene di resistenza all'ampicillina. Le risultanti colonie sono state scelte sulla base della complementazione della  $\beta$ -galattosidasi. I cloni positivi, sono stati prelevati e inoculati in mezzo liquido selettivo con ampicillina.

Il DNA plasmidico è stato purificato mediante protocollo miniprep. Al fine di verificare la presenza dell'inserito, è stata condotta un'amplificazione sul plasmide purificato con i primer universali del vettore Sp6 e T7 secondo il seguente profilo termico: 1 stadio a 94 °C per 5 min seguito da 40 cicli comprendenti 94 °C per 30 sec, 45 °C per 30 sec, 72 °C per 1 min e da 7 min a 72 °C. Successivamente i cloni sono stati sequenziati presso l'istituto San Michele all'Adige utilizzando il kit ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti nei database utilizzando l'algoritmo BLASTX (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e con un database di melo costruito *ad hoc* con EST di melo.

Le sequenze sono state categorizzate secondo i criteri della Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>).

### 2.1.5 Analisi Di Espressione

#### 2.1.5.1 Sintesi cDNA a singolo filamento

La sintesi del cDNA singolo filamento è stata effettuata a partire da 2  $\mu$ g di RNA di seme, peduncolo e zone di abscissione trattato con DNAasi, in un volume finale di 40  $\mu$ l. La reazione è stata condotta in presenza di 1U di RNAsi (RNAsi inibitore) (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA), 200 U di M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), tampone M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) (1X),

oligo-dT (2,5  $\mu$ M), dNTP (1 mM). Il profilo termico utilizzato prevede tre diversi stadi: il primo a 70 °C per 10 min, il secondo a 37 °C per 90 min e l'ultimo a 95 °C per 5 min.

#### 2.1.5.2 PCR semi-quantitativa

L'amplificazione di prodotti con lunghezza compresa tra 110 e 200pb è stata condotta a partire da 0,8  $\mu$ l di cDNA singolo filamento in un volume di 20  $\mu$ l impiegando i primer in tabella 2.3 alla concentrazione di 2,8 ng/ $\mu$ l. La reazione è avvenuta in presenza di buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (1X), MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (1,5 mM), dNTP (0,24 mM), 0,4U di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Il profilo termico impiegato è il seguente: uno stadio a 95 °C per 10 min, seguito da un numero di cicli compreso tra 24 e 28, a seconda del gene, comprendenti 94 °C per 30 sec, 63 °C per 20 sec, 72 °C per 15 sec e uno stadio finale a 72 °C per 7 min. Alle stesse condizioni è stata condotta la reazione di PCR del cDNA singolo filamento utilizzando i primer per il gene costitutivo rRNA 18s, 18s-F (5'-GTTACTTTTAGGACTCCGCC -3') e 18s-R (5'-TTCCTTTAAGTTTCAGCCTTG -3') ad una concentrazione finale di 2,8 ng/ $\mu$ l. Il profilo termico impiegato è il seguente: uno stadio a 95 °C per 10 min, 25 cicli comprendenti 94 °C per 30 sec, 64 °C per 20 sec e 72 °C per 4 sec, seguiti da uno stadio finale a 72 °C per 7 min. I prodotti di amplificazione sono stati separati elettroforeticamente su gel di agarosio al 2% colorati con una soluzione di etidio bromuro 1 mg/ml allo 0,1%. Il gel è stato poi analizzato grazie al 1D Image Analysis Software (Kodak). Per ogni campione sono state fatte tre repliche. Il gene costitutivo è stato utilizzato per avere una quantificazione di base dei cDNA amplificati.

**Tabella 2.3: sequenze dei primer impiegati per le analisi di espressione RT-PCR. I primer sono stati disegnati in modo che la dimensione del prodotto di amplificazione fosse compresa tra 110 e 200 pb e la temperatura di appaiamento tra 60 e 64 °C.**

| <b>Nome primer</b> |     | <b>Sequenza primer</b> |     |
|--------------------|-----|------------------------|-----|
| C014.1F            | 5'- | GAACATGATAACGAAAGGGC   | -3' |
| C014.1R            | 5'- | TGTGAATTATGAGTCTCCACC  | -3' |
| C031.1F            | 5'- | GAAATGGTGATTCTGAAGGG   | -3' |
| C031.1R            | 5'- | GGTTTGCTGATGTAATTACCC  | -3' |
| C112.1F            | 5'- | GCCTCGTATCACATGGAAGC   | -3' |
| C112.1R            | 5'- | ACCTCTGCGTCATCAACTGG   | -3' |
| C160.1F            | 5'- | TGTGACTTCAATGGCGTAGC   | -3' |
| C160.1R            | 5'- | TGGAATGTGTGCGAGTTCACC  | -3' |
| C213.2F            | 5'- | GATCGCCTAGCCACTTTCAG   | -3' |
| C213.2R            | 5'- | CCGCGAAGTCATAGTGATTG   | -3' |
| C270.1F            | 5'- | GAAGGATGGAGCATGGTTGT   | -3' |
| C270.1R            | 5'- | TCTCTCGTCGTCTCCTCACA   | -3' |
| P204.1F            | 5'- | ACCACCAGGAAAACAACAGC   | -3' |
| P204.1R            | 5'- | TCAGTTGTGGGAAGCAACAG   | -3' |
| P306.1F            | 5'- | ATTCGGCTTCCCTGACGG     | -3' |
| P306.1R            | 5'- | CGACAGCACCAAATCACCG    | -3' |
| S020.1F            | 5'- | ATGCTTAGGTTGCCTCCTTG   | -3' |
| S020.1R            | 5'- | GGCTGACCCCTTCATGTTTA   | -3' |
| S035.1F            | 5'- | CAGATGACACCAGTACATAGTG | -3' |
| S035.1R            | 5'- | AGAAACGCTTCATCAGAACC   | -3' |

## ***2.2 Arabidopsis thaliana***

### **2.2.1 Materiale Vegetale**

Sono state ordinate presso l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, The Ohio State University, Columbus, OH, USA) 38 linee Salk di *Arabidopsis thaliana* var. Columbia con inserzioni T-DNA (Tabella 3.2). I semi sono stati sterilizzati effettuando un lavaggio con etanolo 70% per 2 minuti e, in seguito, effettuando un lavaggio con una soluzione con 50% (v/v) di ipoclorito di sodio e 0,05% (v/v) di Triton X-100 per 20 minuti, seguita da tre risciacqui con acqua deionizzata sterile. I semi sono stati vernalizzati per 4 giorni al buio a 4 °C.

In seguito i semi sono stati seminati su piastre petri contenenti terreno 1/2 MSNS (Murashige-Skoog no sugar) con 8 g L<sup>-1</sup> di agar (pH 5.6-5.7), in assenza di saccarosio

e ormoni. Le piastre sono state trasferite ad una temperatura di 22 °C con luce continua e fatte crescere per 7-10 giorni prima di essere trapiantate. I semenzali sono stati trasferiti in terriccio 1:2 (v/v) Perlite:Jiffy Mix (Midwest Perlite, Appleton, WI, USA; Jiffy Products of America, Batavia, IL, USA) e poste in camera di crescita (Enconair Ecological Chambers Inc., Winnipeg, MN, Canada) con 16 ore di luce e 8 di buio a 22-23 °C. L'intensità della luce utilizzata è stata di 150 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ed è stata fornita come mix di luce incandescente e fluorescente fredda. I vasi sono stati ombreggiati per i primi 3-5 giorni per minimizzare lo shock da trapianto. L'acqua è stata fornita costantemente dal fondo del vaso da una soluzione Hoagland 10% (v/v) mediante un sistema basato sull'utilizzo di strisce di feltro (Vattex, Hummerts, St. Louis, USA). Sono stati raccolti semi dalle silique di ogni singola pianta, una volta che fossero diventate secche. Tutti i semi sono stati essiccati per un minimo di una settimana prima di essere riseminati.

### **2.2.2 Risposte All'etilene**

La sensibilità all'etilene è stata determinata trattando i semenzali con etilene 10 ppm per 3 giorni al buio come descritto da (Chen and Bleecker, 1995) e con 0,6 ppm etilene su piante mature per 48h cresciute in regime di 16 ore di luce e 8 di buio.

### **2.2.3 Estrazione Acidi Nucleici**

Il tessuto vegetale è stato congelato in azoto liquido; successivamente è stato aggiunto buffer TES-Lysis (50 mM Tris pH8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% p/v SDS, 1% p/v sarcosile) ed è stata eseguita un'estrazione con mix fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1). I campioni sono stati centrifugati per 5 min a 12000 g e la risultante fase acquosa è stata separata due volte con buffer cloroformio:alcol isoamilico (24:1). Gli acidi nucleici sono stati fatti precipitare a 4 °C con isopropanolo e 10 M NH<sub>4</sub>OAc (un terzo di volume) e risospesi in TE. Mezzo volume della soluzione 6 M LiCl è stato aggiunto ai campioni, incubato a 4 °C per 4 ore e

poi centrifugato per 15 min a 12000 g. Il DNA (nel surnatante) è stato fatto precipitare aggiungendo 10 M NH<sub>4</sub>OAc (1/3 volume) e etanolo, mentre l'RNA (nel pellet) è stato lavato con etanolo e risospeso in acqua trattata con DEPC (1 mg/ ml). La resa in termini di DNA/RNA è stata quantificata usando uno Smart Spec 3000 Biorad (Hercules, CA, USA). La qualità degli acidi nucleici estratti è stata valutata mediante gel elettroforesi.

## 2.2.4 Genotipizzazione Linee Salk

Sono state condotte PCR di genotipizzazione per mutanti singoli usando coppie di primer specifici per i differenti geni (Tabella 2.4), e il primer LB-P745 5'-AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3' per il T-DNA, in modo tale da poter genotipizzare le piante in due reazioni di PCR. Le condizioni di PCR utilizzate sono: uno stadio a 95 °C per 5 min, seguito da 30 cicli comprendenti 94 °C per 15 sec, 62 °C per 30 sec, 72 °C per 3 min. I prodotti di amplificazione ottenuti avevano una dimensione variabile tra 1000 e 2000pb e sono stati corsi su gel di agarosio all'1,5%.

**Tabella 2.4: primer disegnati per genotipizzare le linee Salk. I primer sono disegnati per dare prodotti compresi tra 800 e 2000pb e per essere utilizzati ad una temperatura di appaiamento di 62 °C.**

| Nome primer  |     | Sequenza                     |     |
|--------------|-----|------------------------------|-----|
| 2g05940-068F | 5'- | GCAATTGATGTTGTTATCAAGCACA    | -3' |
| 2g05940-068R | 5'- | AAGACTATAATGATATTCCTATGGGGAC | -3' |
| 2g07180-660F | 5'- | AGAGAGTTTAGCATTGTAACCCTGCAC  | -3' |
| 2g07180-660R | 5'- | AAGCAGTTCAGGCCGATTATATTC     | -3' |
| 2g07180-661F | 5'- | GCATTACATACACCTTTCAGGGGAA    | -3' |
| 2g07180-661R | 5'- | GAGGTTTCGGAGTGTTGTATAAAGGA   | -3' |
| BET1-636F    | 5'- | CTACAACAACAATGTTGAACCAA      | -3' |
| BET1-636R    | 5'- | TAAATCAGCTTCGTCGGCGTTT       | -3' |
| BET1-736F    | 5'- | AATCTAATGGATCAGTTTCATCGATGG  | -3' |
| BET1-736R    | 5'- | TGGGTCAACAGACATGAAAGGTGA     | -3' |
| BET1-787F    | 5'- | CCTCCAAGGCACGCTCATTCTCATGTT  | -3' |
| BET1-787R    | 5'- | GTCCTGGGCCTTTCAGTTGCGAAGA    | -3' |
| BIG-237F     | 5'- | CCCCTGCTTGAGATGTCAAAAGAT     | -3' |
| BIG-237R     | 5'- | CACTGAATCAAGTTTAGGTCGGTATC   | -3' |
| BIG-495F     | 5'- | CAAAAACAATAAGTAAAGGCGAGC     | -3' |
| BIG-495R     | 5'- | TTTCTTAAGTGTCCGGGGTTGTCT     | -3' |

| <b>Nome primer</b> |     | <b>Sequenza</b>               |     |
|--------------------|-----|-------------------------------|-----|
| CALS-560F          | 5'- | CAGTGCATATAGTTGTCAAAGTTTGTTTC | -3' |
| CALS-560R          | 5'- | TCATCAGCAACTTCCACATCTTCT      | -3' |
| CycT1-359F         | 5'- | AATTGGCTGGTTAAACCAAGGAAAAG    | -3' |
| CycT1-359R         | 5'- | GTCGCGCTTAAAGTTACGGTTTTG      | -3' |
| CycT1-685bF        | 5'- | TTCATTGCACAACAAGACAC          | -3' |
| CycT1-685bR        | 5'- | TAGAAAGGCAAGTAGGACAACC        | -3' |
| CycT1-685F         | 5'- | CATGGAGATCTTATCTCAATCATGATGT  | -3' |
| CycT1-685R         | 5'- | ATGCCACTAGAAAGGCAAGTAGGACA    | -3' |
| GlyHy17-140F       | 5'- | GGAACCACACCTTTGTTCTGCATATA    | -3' |
| GlyHy17-140R       | 5'- | CCTGTTCTTCTTCTTCTTCACTCTTC    | -3' |
| GlyHy17-494F       | 5'- | TGAAGAGGAGCTTGAGCTTATTGT      | -3' |
| GlyHy17-494R       | 5'- | GTGTTATCAACAAATAAATAAAATGGGC  | -3' |
| NhaD-687F          | 5'- | AGAGGAAGCGGCTGAGTGATGAT       | -3' |
| NhaD-687R          | 5'- | GATCTTTCAAACCAAAAAACAAAGC     | -3' |
| PepsinA-509F       | 5'- | TGAGTGTACATGTCAAGTACGACAAGC   | -3' |
| PepsinA-509R       | 5'- | AAACTAGTAATCACTGAACTATCATGCA  | -3' |
| RHM1-589F          | 5'- | AAGGTTTGAGAAGTTGAGAGCCAC      | -3' |
| RHM1-589R          | 5'- | AAGAGCATCCTCATCAGTTTCACCA     | -3' |
| RHM1-839F          | 5'- | TTTGAGAGAAATTTTCGCGACTCG      | -3' |
| RHM1-839R          | 5'- | GGAAAACGTGAAGAATTTTCGACGG     | -3' |
| SERK-021F          | 5'- | TCGAAACCTGTTGAGATTACGAGG      | -3' |
| SERK-021R          | 5'- | AGATAACTCAACGGCGTGCAAA        | -3' |
| SERK-572F          | 5'- | GGGTAACAAATGTAATCTGC          | -3' |
| SERK-572R          | 5'- | GCCAGAGAACTATGATTAGTG         | -3' |
| SgrPort-462F       | 5'- | CTGTGCTAAATTTAACGACTACCAAAC   | -3' |
| SgrPort-462R       | 5'- | AGGAAACACCCGATACATGTTCCA      | -3' |
| SgrPort-700F       | 5'- | AGGAAGAGAGCAGGATAGCGATCAGTC   | -3' |
| SgrPort-700R       | 5'- | CGAGGAAACACCCGATACATGTTCCAGT  | -3' |
| SNRK1-855F         | 5'- | GACGAAATTATTTGATTTTTGGTTCC    | -3' |
| SNRK1-855R         | 5'- | TTCTCACGGTCCTTTTCAGCATTTA     | -3' |
| SNRK1-939F         | 5'- | AAATCAATCTTGGTGGCATGATGC      | -3' |
| SNRK1-939R         | 5'- | TTCCTAACAGCAGCGCAGATGGTAT     | -3' |
| STGREEN-891F       | 5'- | CAAACAACCTTGCAACCTGCAC        | -3' |
| STGREEN-891R       | 5'- | TGACTCCTCCGGTTCATCAATA        | -3' |
| STGREEN-990F       | 5'- | CTCTGCTCTTTGAAACCCAAATC       | -3' |
| STGREEN-990R       | 5'- | TACCTGCGTTTGTGTCCTTGTTTC      | -3' |
| TGA3-274F          | 5'- | TATTTGTCACTAAGTCAGGG          | -3' |
| TGA3-274R          | 5'- | GCACAAGAATAGATCAAAGC          | -3' |

## 2.2.4 Analisi Di Espressione

### 2.2.4.1 Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA singolo filamento è stata effettuata a partire da 1 µg di RNA di zone di abscissione trattato con DNAasi, in un volume finale di 10 µl. La reazione è stata condotta in presenza di 40U di RNaseOUT™ (RNAasi inibitore) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con il kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore.

### 2.2.4.2 Real Time PCR

Per quantificare i livelli di mRNA è stato utilizzato il metodo di quantificazione relativa con l'elaborazione della curva standard per verificare il corretto funzionamento dei primer. Utilizzando nella curva standard diluizioni seriali 1:5 del cDNA di controllo, si sono ottenute, come atteso, curve di amplificazione a circa 2,5 cicli l'una dall'altra. Il metodo prevede che si esegua l'amplificazione per il gene di interesse e per un gene costitutivo; il costitutivo scelto è SAND (At2g28390) (Czechowski et al., 2005). Dalla reazione di amplificazione del cDNA diluito si ottengono così le rette di taratura standard utili a valutare l'efficienza di amplificazione. Una volta controllata l'efficienza della reazione (per avere un'efficienza massima, la pendenza della retta standard dovrebbe essere pari a -3,3), si analizzano i risultati ottenuti a partire dal ciclo soglia di ciascun campione.

I prodotti di PCR sono stati misurati utilizzando un termociclatore Bio-Rad iCycler™ iQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e l'analisi dei risultati è stata effettuata mediante il Bio-Rad iCycler™ iQ Real-Time Detection Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Per le reazioni di PCR è stato usato il kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nel modo seguente: 7,5 µl SYBR GREEN PCR MM 2X, 1,5 µl Primer F (2 µM), 1,5 µl Primer R (2 µM), 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl cDNA.

Il profilo termico impiegato è il seguente: uno stadio a 95 °C per 5 min, seguito da 60 cicli comprendenti 94 °C per 15 sec, 61 °C per 20 sec, 72 °C per 15 sec, 78 °C

per 10 sec durante i quali è stata impostata la fase di rilevamento della fluorescenza. Inoltre, al termine del profilo termico, è stato impostato un protocollo di dissociazione, con aumento progressivo della temperatura da 61 °C a 95 °C in 20 minuti. e uno stadio finale a 72 °C per 7 min per verificare la presenza di prodotti di amplificazione aspecifici.

**Tabella 2.5: primer specifici per real time RT-PCR disegnati sui geni descritti nella prima colonna. La direzione indica i primer Forwar (F) e Reverse (R). Per alcuni geni sono state disegnate più coppie di primer indicate con un numero progressivo dopo F e R nella colonna "Direzione".**

| Gene #    | Nome primer | Direzione | Primer                    | Tm | Lunghezza Prodotto |
|-----------|-------------|-----------|---------------------------|----|--------------------|
| At1g23080 | Pin7        | F         | CTCTTGTTGCTTTTCAGGTGGG    | 62 | 98pb               |
|           |             | R         | AACTGAACATTGCCATACCAAGAC  | 62 |                    |
| At4g01420 | Pin4        | F         | CAACGGAACAATCTGAACAAGG    | 60 | 68pb               |
|           |             | R         | CCACCACCTCTAGCATTACTC     | 60 |                    |
| At3g02260 | big         | F         | CTCAGGCGATCCTTCTACTATCTC  | 61 | 73pb               |
|           |             | R         | TTGGTCCACTAAACCTTGATTGAG  | 61 |                    |
|           |             | F1        | GGGCTTCAAGATATCTGTCTCC    | 60 | 80pb               |
|           |             | R1        | GCTGATGTAGTACCCACATGC     | 61 |                    |
| At4g32940 | γ-vpe       | F         | CCTGAAGTGCTAAACAAGTACG    | 60 | 88pb               |
|           |             | R         | CTCTCGAAAGCTCTCACCTG      | 60 |                    |
| At3g01090 | snrk1       | F         | ATGGAGATGGAGGAGAAAGTGAG   | 61 | 79pb               |
|           |             | R         | TCATAGAGACGGATGATGTGAGG   | 61 |                    |
| At5g39440 | snrk1.3     | F         | TCGCTCTAAGATTAAGAACATGGG  | 60 | 95pb               |
|           |             | R         | TATTGACGGATGATATGAGGATGC  | 60 |                    |
| At1g11820 | glyhy17     | F         | TTCATGTATCTGGAAGTGAACG    | 60 | 66pb               |
|           |             | R         | TATTCCGACCTTCTTGCTTCC     | 60 |                    |
| At3g58170 | BET11       | F         | TCTGGCGATATAAATGAAGAGGTC  | 60 | 70pb               |
|           |             | R         | GAATCCATATCATTGCCATTCTG   | 60 |                    |
| At2g31960 | CAL3        | F         | TATGCGTTTGAGAAGGCACAC     | 61 | 105pb              |
|           |             | R         | TTGTTTCATTCTCCCGTTCTAACC  | 61 |                    |
|           |             | F1        | CATATGGTGGTGAAGACGAAGC    | 61 | 85pb               |
|           |             | R1        | TCTACTTCTTTGCTTCTTTGCT    | 61 |                    |
| At2g30680 | CAL1        | F         | CTTCAAGCGACAATGAACAC      | 61 | 99pb               |
|           |             | R         | TTCCCTTGTTTCATCATTCTTCG   | 61 |                    |
|           |             | F1        | GCTGACAGTTACATTCAACATGC   | 61 | 83pb               |
|           |             | R1        | AAGTTGTACATCTCCGAAAGAAGC  | 61 |                    |
| At2g19170 | SLP3        | F         | ATGATTCTGGGATGCTCTTTGAG   | 61 | 110pb              |
|           |             | R         | AAGTGGTCTGCCTGCTCAG       | 61 |                    |
|           |             | F1        | CAATTATGTTGGTGAAGGATTTGCG | 61 | 105pb              |
|           |             | R1        | GCTCCATTGAGGATGCTTCTG     | 61 |                    |
| At4g44000 | sim-STGRN2  | F         | GAGTGGTATGAGTTTATTGCAGGA  | 60 | 86pb               |
|           |             | R         | ACAGCTTTAAGTACCAAAGGCA    | 60 |                    |

| Gene #    | Nome primer | Direzione | Primer                      | Tm | Lunghezza Prodotto |
|-----------|-------------|-----------|-----------------------------|----|--------------------|
| At4g22920 | NYE1        | F         | CGTTCATTGTCACATAAGCGG       | 60 | 101pb              |
|           |             | R         | AAAGCCTTCAACACCACAGG        | 61 |                    |
| At4g11910 | sim-STGRN1  | F         | CCAGAGAAACTGAGCACTAGC       | 60 | 83pb               |
|           |             | R         | TCTTGCAACAGGAACAATAGATCG    | 61 |                    |
|           |             | F1        | CTTCCAAGAACTTACACTCTTACTCAC | 61 | 96pb               |
|           |             | R1        | CCCATCCTTGCAACTGAGAG        | 60 |                    |
| At1g63000 | NRS/ER      | F         | CCAAAGCTATGGTGGAGGAG        | 60 | 110pb              |
|           |             | R         | TCTTCGTGATGAAGTTTCTCGG      | 60 |                    |
| Atg78570  | RHM1        | F         | CCAAAGCCATGGTTCGAGGAG       | 63 | 130pb              |
|           |             | R         | TACTTTGTTGTACCTGGAGATCTTGG  | 62 |                    |
| At3g14790 | RHM3        | F         | AAACAAAGGCAATGGTGGAAAGAG    | 62 | 80pb               |
|           |             | R         | CAGATGAGATTGGCATCCGC        | 61 |                    |
| At1g71830 | serk1       | F         | CTTTCAAAGCTGAGATTTCTCCG     | 61 | 96pb               |
|           |             | R         | TTGATAGATCTAACACTTGAAGGGTAG | 61 |                    |
| At2g13800 | serk5       | F         | AATGCCACTCACGTTACTCCATGTT   | 61 | 110pb              |
|           |             | R         | ATTAGCACTCCCCAGGTCAAG       | 62 |                    |



## 3. RISULTATI

### 3.1 ANALISI cDNA-AFLP E GENE ONTOLOGY

L'analisi cDNA-AFLP ha permesso di identificare facilmente ed in breve tempo geni differenzialmente espressi in diversi tessuti in seguito al trattamento con BA e putativamente coinvolti nell'attivazione delle zone di abscissione e nel processo di senescenza del frutto.

L'analisi è stata condotta su due popolazioni di frutti AF e NAF al terzo, al quinto e al settimo giorno dopo il trattamento con BA, relativamente a vari tessuti (cortex, peduncolo e seme). Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 53 combinazioni di primer con due o tre basi selettive per avere un numero sufficiente di bande da analizzare (Tabella 2.2). Un accumulo differenziale dei trascritti nelle due popolazioni è stato osservato per 655 frammenti di lunghezza compresa tra le 100 e le 700 pb (Figura 3.1). Tali frammenti sono stati riamplicati, clonati in vettore pGem T-Easy (Promega, Madison, WI, USA) e sequenziati ottenendo 278 EST totali, di cui 169 relative a cortex, 70 a peduncolo e 39 a seme (Allegato A - Tabella A.1). Ad ogni sequenza è stata assegnata una funzione putativa sulla base delle omologie con le sequenze presenti nelle banche dati (GenBank CDS translation, RefSeq Proteins, PDB, SwissProt, PIR, PRF) utilizzando l'algoritmo BLASTX (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Gish et al., 1993).

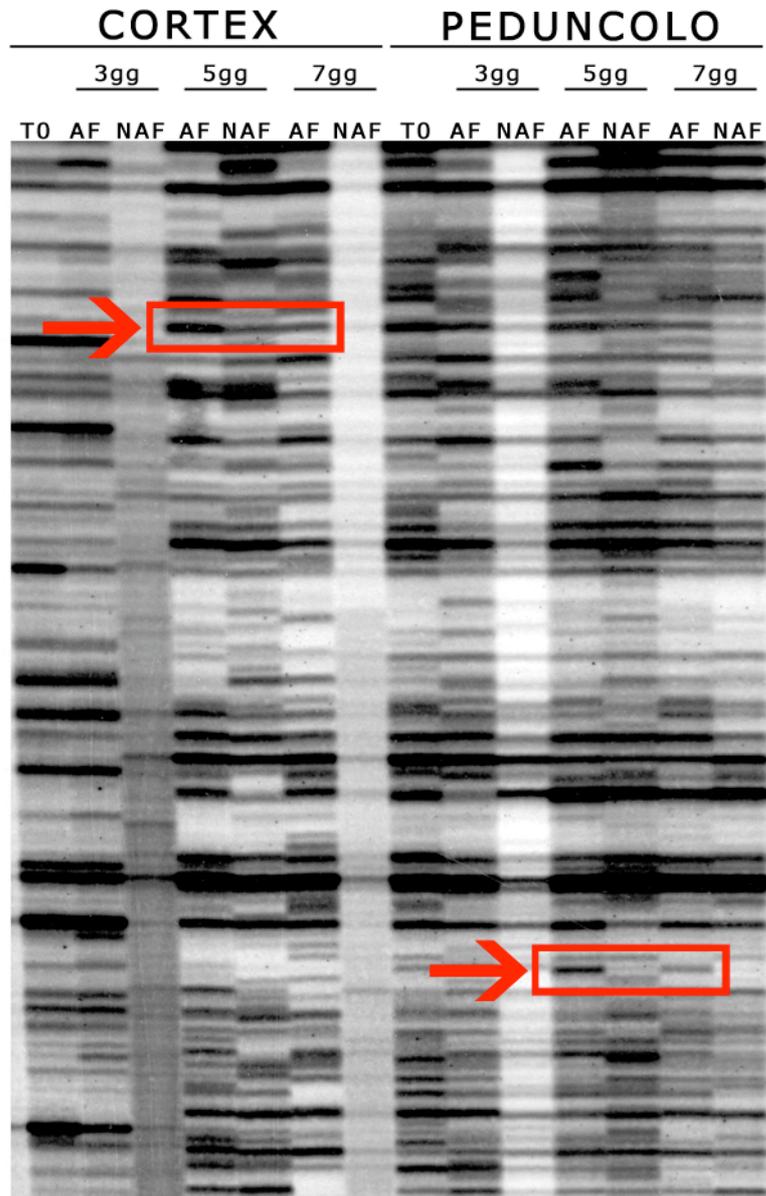
Successivamente sono stati prodotti 166 contig delle sequenze raggruppate in cluster grazie alla ricerca con l'algoritmo BLASTX in database ottenuto da EST di melo. Altre 93 sequenze sono state classificate come singleton. Tramite i criteri della Gene Ontology (<http://geneontology.org>), per mezzo del software Blast2GO (<http://www.blast2go.de>) (Conesa et al., 2005), le sequenze sono state ulteriormente suddivise. Tale classificazione ha permesso d'individuare i compartimenti cellulari, i gruppi funzionali e i processi metabolici con il maggior numero di geni differenzialmente espressi e dunque eventualmente coinvolti nella segnalazione dell'abscissione, nella senescenza e nella risposta al trattamento con BA (Allegato B - Figure B.1-B.18).

In linea generale sono stati individuati in cortex (cloni indicati con la sigla C) e semi (cloni indicati con la sigla S) una prevalenza di geni regolati positivamente, rispetto a quelli regolati negativamente, ad eccezione dei peduncoli (cloni indicati con la sigla P) in cui avviene il contrario (Allegato A - Tabella A.1). Inoltre, nei semi la differenza fra le due categorie è molto più marcata rispetto agli altri tessuti, con una chiara prevalenza dei cloni regolati positivamente, anche se il numero ristretto di sequenze analizzate per questo tessuto pone alcuni limiti all'analisi. A livello cellulare è evidente dalla categorizzazione della Gene Ontology uno spiccato coinvolgimento dei plastidi, del sistema di endomembrane e del mitocondrio in tutti i tessuti (Allegato B - Figure B.1-B.18). Nei peduncoli, diversamente da cortex e semi, si registra un considerevole coinvolgimento di complessi proteici, in particolare complessi di ubiquitinazione SCF.

L'analisi delle funzioni ha permesso d'individuare una serie di attività enzimatiche coinvolte nei vari tessuti, in particolare attività idrolasica (C013, C027, C038, C101, C120, C126, C145, C174, C160, C168, C208, C221, C265, C268, C283, C299, P111, P126, P159, P161, P171, P306, P333, S012, S016, S018, S021, S028, S030, S031, S035), attività ossidoreduttasica (C002, C004, C011, C105, C182, C183, C198, C235, C267, C302, P201, S008, S015) e trasferasica (C008, C010, C012, C016, C028, C038, C051, C104, C114, C167, C191, C211, C213, C228, C232, C234, C236, C270, C274, C286, P151, P237, P302, P312, P318, P319, P324, P332, S007, S022, S029). I geni associati all'attività idrolasica codificano principalmente per enzimi con azione proteolitica (C027, C120, C208, P161, P306, S004, S012, S016, S018, S021), o comunque coinvolti nei processi di degradazione proteica, come la pathway dell'ubiquitina (C101, C174, C268, P126, S017), mentre la maggior parte degli enzimi con azione trasferasica sono rappresentati da chinasi (C008, C010, C012, C016, C114, C167, C191, C234, C236, C270, C286, P151, P237, P302, P312, P318, P319, P324, P332, S022). È stata registrata, inoltre, un'aumentata attività del trasporto (C014, C031, C037, C101, C106, C115, C121, C142, C197, C202, C209, C263, C285, C296, P112, P135, P144, P154, P209, P335, S003, S017, S020, S032, S033) di ormoni, zuccheri e ioni, soprattutto nel

seme, oltre che un significativo coinvolgimento di svariati fattori in grado di legarsi ad acidi nucleici, ioni o altre proteine in cortex e peduncolo. E' stato registrato anche un importante coinvolgimento di fattori, cofattori e regolatori implicati nella trascrizione (C019, C046, C109, C131, C175, C186, C258, P105, P109, P149, P103, P208, P313, S019). A questo riguardo è interessante il dato fornito dall'analisi dei peduncoli secondo cui, contrariamente all'andamento generale riscontrato in tale tessuto, prevalgono cloni sovraespressi.

Compatibilmente con i risultati ottenuti dall'analisi delle funzioni, il metabolismo proteico (C027, C101, C120, C126, C137, C142, C149, C174, C191, C208, C223, C268, C286, C300, P126, P159, P161, P171, P189, P237, P306, P318, P319, S012, S016, S017, S018) rappresenta il processo coinvolto in modo più significativo nei vari tessuti. Tale processo comprende vari aspetti della regolazione proteica, in particolare sembra essere implicato il catabolismo delle proteine nei frutti destinati ad abscindere. In linea generale si può affermare che siano sollecitati dal trattamento anche molti altri aspetti del metabolismo primario: in particolare, in cortex e semi si è registrata una considerevole attivazione del metabolismo dei carboidrati (C030, C038, C039, C135, C211, C213, C228, C267, C274, C302, P112, P160, S020, S022). Il processo di trasduzione del segnale (C031, C126, C191, C286, C303, P149, P189, P237, P328, S008) è apparso ugualmente rappresentato nei vari tessuti: in particolare, sono attivati meccanismi di trasduzione mediati da ormoni, come auxina, etilene e giasmonati. Tale dato conferma l'implicazione di numerosi enzimi con attività chinasi, presumibilmente responsabili di eventi fosforilativi a cascata.



**Figura 3.1:** esempio di lastra cDNA-AFLP con bande differenzialmente regolate in frutti abscidenti (AF) e non abscidenti (NAF) su campioni di cortex e peduncolo al T0, 3, 5 e 7 giorni dopo il trattamento con BA. Nei riquadri indicati dalle frecce sono visibili alcune bande differenzialmente espresse. In particolare queste sono sovraespresse negli AF al quinto giorno e sottoespresse nei NAF al quinto giorno e negli stessi AF al settimo giorno.

## **3.2 GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI DURANTE L'ABSCISSIONE**

### **3.2.1 Metabolismo dei carboidrati**

Cloni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati individuati con il cDNA-AFLP sono: C013 (numero di accesso DY242174) codificante per una beta-amilasi; C038 (numero di accesso DY241964) codificante per una putativa trealosio-6-fosfato sintasi, indispensabile per regolare il flusso di zuccheri nel ciclo glicolitico e quindi per il normale sviluppo della pianta (Eastmond et al., 2002; Schluempmann et al., 2003); C039 (numero di accesso DY241973) codificante per una UDP-arabinosio epimerasi, enzima che catalizza l'interconversione di arabinosio a xylosio. C039 è simile a Murus 4 (MUR4) che codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi della parete cellulare (Burget et al., 2003). Il clone C051 (numero di accesso DY241933) codifica per una UDP-glucosio:sterolo glicosiltrasferasi putativamente coinvolta nella produzione della membrana cellulare e del fragmoplasto (Hong et al., 2001). L'EST C104 (numero di accesso DY241990) è codificante per una trasferasi di gruppi glicosilici ed è regolata positivamente; C016 (numero di accesso DY241951) codifica per un precursore di un traslocatore dell'oxoglutarato/malato ed è regolato negativamente nei frutti abscidenti; C135 (numero di accesso DY242010) codifica per l'enzima UDP-glucosio-4,6-deidratasi responsabile della biosintesi del ramnosio, regolato negativamente; C145 (numero di accesso DY242055) codificante per una invertasi e regolato positivamente; C228 (numero di accesso DY242112) codificante per una citrato sintasi, enzima mitocondriale positivamente regolato.

I seguenti cloni coinvolti nel metabolismo cellulare sono stati identificati come negativamente regolati tramite cDNA-AFLP: C267 (numero di accesso DY242093) codificante per una malato ossidoriduttasi; C302 (numero di accesso DY242157) codificante per una mannosio reductasi NADPH-dipendente; P112 (numero di accesso DY241980) codificante per un precursore di un traslocatore dell'oxoglutarato/malato; S013 (numero di accesso DY241935) codificante per una

piruvato decarbossilasi; S015 (numero di accesso DY241957) codificante per una alcool deidrogenasi e S028 (numero di accesso DY241927) codificante per un cellulasi.

### **3.2.2 Attività mitocondriale, plastidiale e delle endomembrane**

Geni differenzialmente espressi relativi all'attività mitocondriale sono i seguenti: C007 (numero di accesso DY241904) codificante per una putativa idratasi enoil-CoA e sovraespresso in cortex di frutti abscindenti; C008 (numero di accesso DY241906) sovraespresso e codificante per una protein-chinasi CBL-interacting 8 (CIPK8) con lo stesso dominio catalitico di SnRK3 (sucrose non-fermenting Related Kinase 3) (Yu et al., 2007); C203 (numero di accesso DY242100), sottoespresso e putativamente codificante per la proteina transmembrana TM9SF, che fa parte del sistema di membrane mitocondriali e agisce come regolatore dell'adesione cellulare, probabilmente controllando il trasporto intracellulare e la composizione della membrana plasmatica.

Oltre ai mitocondri, altri compartimenti cellulari come plastidi ed endomembrane sono profondamente coinvolti nel processo di segnalazione dell'abscissione, come dimostrato dall'espressione differenziale delle seguenti EST: C013 (numero di accesso DY242174) codificante per una beta-amilasi attiva nel cloroplasto e responsabile, assieme ad altre beta-amilasi, della regolazione del metabolismo del maltosio che raggiunge il citoplasma dopo essere stato sintetizzato (Sparla et al., 2006); C038 (numero di accesso DY241964) codificante per l'enzima trealosio-6-fosfato sintasi, indispensabile per la regolazione dell'apporto di zuccheri nel ciclo della glicolisi e per la catalisi del primo passaggio della sintesi del trealosio, essenziale per la maturazione dell'embrione in *Arabidopsis* (Eastmond et al., 2002); C003 (numero di accesso DY21895) codificante per una cinnamil-alcol deidrogenasi coinvolta nella biosintesi della lignina (Sibout et al., 2005); C014 (numero di accesso DY241902) codificante per Bet1-like (SNARE), una proteina associata alle membrane con un ruolo fondamentale nella fusione di membrane intra-cellulari e

nell'indirizzamento delle vescicole con coinvolgimento dei meccanismi di trasporto proteico (Tai and Banfield, 2001). Tutti i suddetti geni sono risultati regolati positivamente in cortex di frutti abscidenti. Al contrario, C115 (numero di accesso DY242009) codificante per TT12 (Transparent Testa 12), proteina di membrana responsabile del trasporto delle proantocianidine (Marinova et al., 2007), è risultato negativamente regolato in cortex.

Molti altri cloni sono stati classificati con la Gene Ontology come deputati al mantenimento del cloroplasto. Tra i cloni regolati positivamente sono il C030 (numero di accesso DY241963) codificante per una proteina LHCP (light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein) responsabile del legame con i pigmenti e della successiva formazione di trimeri necessari per l'assemblamento del fotosistema I e II, il C178 (numero di accesso DY242032) codificante per un citocromo F, il C269 (numero di accesso DY242115) codificante per la subunità 7 della NADH deidrogenasi, il C283 (numero di accesso DY242155) codificante per una proteina della famiglia delle fosfoesterasi calcineurin-like, il P189 (numero di accesso DY242063) codificante per una protein fosfatasi , e il P329 (numero di accesso DY242108) codificante per una proteina fogliare chloroplast defective. Tra i cloni regolati negativamente il C105 (numero di accesso DY241940) codificante per una NADPH-protoclorofillide ossidoreduttasi, il C131 (numero di accesso DY242046) codificante per il fattore sigma 2, il C182 (numero di accesso DY242058) codificante per il precursore della ferredoxina-NADPH<sup>+</sup> riduttasi, e il P307 (numero di accesso DY242128) codificante per ycf2.

### **3.2.3 Attività di legame, idrolitica e chinasica**

Dal punto di vista funzionale sono stati trovati un elevato numero di geni sovraespressi coinvolti nel trasporto, attività di legame, attività idrolitica e chinasica (Allegato B - Figure B.1-18). Tra i geni associati all'attività di trasporto sono particolarmente interessanti i seguenti cloni sovraespressi: C197 (numero di accesso

DY242142) codificante per un trasportatore del potassio; C285 (numero di accesso DY242160) e C296 (numero di accesso DY242166), entrambi codificanti per proteine transmembrana della famiglia di trasportatori ABC (ATP-binding Cassette), coinvolti nel trasporto di prodotti metabolici, lipidi e steroli, previo legame con ATP. Altri geni relativi all'attività di trasporto, ma sottoespressi, sono risultati: P305 (numero di accesso DY242139) codificante per un trasportatore del fosfato; P335 (numero di accesso DY242067) codificante per il trasportatore del solfato AtST1 e C121 (numero di accesso DY242053) codificante per una gamma-proteina intrinseca del tonoplasto.

I geni associati all'attività di legame, isolati tramite cDNA-AFLP e putativamente differenzialmente espressi sono: S008 (numero di accesso DY241966) codificante per una lipossigenasi e S027 (numero di accesso DY241916) codificante per una proteina contenente il dominio per un fattore di splicing PWI (Blencowe and Ouzounis, 1999), entrambi sovraespressi; sono risultati sotto espressi i cloni C126 (numero di accesso DY242018) codificante per una fostatasi e C142 (numero di accesso DY242039) codificante per una proteina ATP binding simile alla katanina, proteina coinvolta nella formazione dei microtubuli, nella biosintesi della parete cellulare e nell'allungamento cellulare (Burk et al., 2001; Hartman et al., 1998).

L'attività idrolitica è risultata stimolata in seguito all'attivazione dell'abscissione con con BA. I cloni differenzialmente espressi sono C002 (numero di accesso DY241893) codificante per una pompa protonica; C026 (numero di accesso DY241921) codificante per una beta-tubulina, e C282 (numero di accesso DY242149) codificante per Rurm1 (ubiquitin-related modifier 1).

Tra i cloni con attività transferasica, i più interessanti sono: C019 (numero di accesso DY241897) codificante per il cofattore di trascrizione HAC1, una acetiltransferasi istonica coinvolta nella determinazione temporale della fioritura (Earley et al., 2007); C211 (numero di accesso DY242090) codificante per una citrato sintasi; C232 (numero di accesso DY242133) codificante per una amminometiltransferasi; C240 (numero di accesso DY242113) codificante per una

proteina con dominio conservato MIR, precursore del fattore 2 dello stroma (SDF2-like protein) .

Molte EST sequenziate sono chinasi, con attività tirosin-chinasica e serin/treonin-chinasica, tra le quali C001 (numero di accesso DY241890) codifica per una serin/treonin protein chinasi AtPK10 e C167 (numero di accesso DY242012) codificante per una tirosin chinasi, entrambe regolate positivamente.

### **3.2.4 Metabolismo proteico, attività di trasporto e trasduzione del segnale**

Nella categoria ontologica del “processo biologico” la maggior parte dei geni regolati positivamente fanno parte della sottocategoria “metabolismo proteico”: C027 (numero di accesso DY241931) codificante per una serina carbossipeptidasi III; C120 (numero di accesso DY242045) codificante per una leucina aminopeptidasi 3 e S016 (numero di accesso DY241967) codificante per un precursore di una carbossipeptidasi.

Altri geni coinvolti nel metabolismo proteico, regolati positivamente e individuati con il cDNA-AFLP sono: C133 (numero di accesso DY241993) codificante per una asparagina sintetasi; C208 (numero di accesso DY242132) codificante per una proteasi subtilisin-like; C232 (numero di accesso DY242133) codificante per una amminometil transferasi; S021 (numero di accesso DY241936) codificante per una cisteina proteasi OTU-like.

Geni coinvolti nel metabolismo proteico, ma regolati negativamente, sono: S018 (numero di accesso DY241986) e P161 (numero di accesso DY241999), entrambi codificanti una asparaginil endopeptidasi; P320 (numero di accesso DY242119) codificante una proteina di legame CD2.

La seconda categoria maggiormente rappresentata tra i processi biologici è l'attività di trasporto per la quale sono stati individuati i geni: S033 (numero di accesso DY241978) codificante per un cotrasportatore del sodio dicarbossilato; C178 (numero di accesso DY242032) codificante per il citocromo F; C182 (numero di accesso DY242058) codificante per una ferrodossina-NADP<sup>+</sup> riduttasi.

Per quanto riguarda i geni coinvolti nella trasduzione del segnale, i seguenti geni sono stati individuati come differenzialmente regolati: C265 (numero di accesso DY242072) codificante una proteina GTP-binding Rab2-like e P138 (numero di accesso DY242097) codificante una protein chinasi calcio dipendente (CDPK19) coinvolta nella risposta all'ABA.

### **3.2.5 Sviluppo**

I geni differenziale espressi associati allo sviluppo sono: C012 (numero di accesso ES605471) codificante per una chinasi ciclina-dipendente (cdk2) responsabile del mantenimento dell'equilibrio tra divisione cellulare e differenziazione cellulare (Da Costa et al., 2006); C109 (numero di accesso DY241981) codificante per una proteina NAM-like; C125 (numero di accesso DY242028) codificante per crooked neck, una proteina di controllo del ciclo cellulare. Infine, la risposta agli stress è rappresentata dai geni: C011 (numero di accesso DY241953) codificante una glutatione reduttasi; C037 (numero di accesso DY241953) codificante una proteina multidrug resistance e C202 (numero di accesso DY242089) codificante una pompa protonica.

E' interessante notare come geni coinvolti in meccanismi di trasduzione del segnale mediati da ormoni, quali auxine, etilene e jasmonati, sono sovraespressi e sottoespressi nella stessa misura. Inoltre, sono presenti molti geni codificanti enzimi con attività chinasica, responsabili di eventi fosforilativi. Sono state, inoltre, identificate molte EST putativamente codificanti per trasportatori di ioni, zuccheri e ormoni.

### **3.2.6 Espressione genica di EST relative al controllo ormonale**

I cloni legati al metabolismo auxinico sono: C046 (numero di accesso DY241965) codificante per una proteina regolata positivamente responsabile del legame con ARF1 (auxin response factor 1); C132 (numero di accesso DY242054) regolato negativamente e codificante per un auxin response factor 7b, omologo di

una ARF2 in *Cucumis sativus*; C303 (numero di accesso DY242162) codificante per una proteina auxin-responsive, simile a SAUR (small auxin upregulated protein) di *Medicago truncatula* e regolato negativamente; P135 (numero di accesso DY242007) codificante per PIN7 e regolato positivamente e P171 (numero di accesso DY242036) codificante per una idrolasi IAA-aminoacid 6 regolato negativamente.

Oltre alle auxine, geni relativi alla biosintesi o al meccanismo di azione di altri ormoni regolati positivamente sono: C005 (numero di accesso DY241901) codificante per una 1-amminociclopropano-1-carbossilato ossidasi; C258 (numero di accesso DY242102) codificante per una proteina calmodulin-binding regolata dall'etilene; S029 (numero di accesso DY241937) codificante per una aminotransferasi con attività 1-amminociclopropan-1-carbossilato sintasi; C175 (numero di accesso DY242004) codificante AREB1 (ABA-responsive element binding protein 1). P109 (numero di accesso DY241961) codificante per scarecow, un modulatore della risposta alle giberelline è risultato invece negativamente regolato nei frutti abscendenti.

### **3.3 ANALISI DI ESPRESSIONE**

#### **3.3.1 Selezione dei geni di interesse**

Per confermare i dati di espressione qualitativi (presenza/assenza) ottenuti dal cDNA-AFLP, sono state condotte prove di espressione con RT-PCR semiquantitativa. A questo scopo, sono stati scelti alcuni geni ritenuti più interessanti in quanto coinvolti nel metabolismo e trasporto degli zuccheri, nella trasduzione del segnale auxinico e geni codificanti proteine coinvolte nel processo di senescenza e nella regolazione del metabolismo.

I geni selezionati sono risultati differenzialmente espressi, in base alle analisi cDNA-AFLP, in cortex, peduncolo e semi e sono stati riportati in Tabella 3.1. Le analisi di espressione sono state condotte su cDNA retrotrascritti da RNA totale di

cortex, peduncolo, semi e zone di abscissione. I primi tre tessuti sono stati scelti per evidenziare i segnali di attivazione e induzione del processo di abscissione a livello dei diversi tessuti del frutto, mentre le zone di abscissione sono state scelte in quanto queste ultime sono rappresentano il target dei segnali prodotti a livello del frutto e/o del seme. I geni considerati per le prove di espressione fanno parte del campione eterogeneo di 278 geni differenzialmente espressi non esclusivamente in relazione al processo di abscissione e all'attivazione delle zone, ma, più in generale, alla risposta al trattamento con BA e alla senescenza. Le EST selezionate sono: a) per quanto riguarda il metabolismo degli zuccheri le EST C112 (una UDP pirofosforilasi non specifica), C114 (subunità catalitica della chinasi SNF1), C160 (glicosil idrolasi appartenente alla famiglia 17) C213 (glucano sintasi putativa) tutte individuate come differenzialmente espresse in cortex; P306 (aspartil proteasi putativa) individuato in peduncolo e S020 (trasportatore degli zuccheri putativo) in seme. Altri geni scelti sono stati: C031 (BIG, dark over-expression of CAB1) trovato in cortex e scelto per il coinvolgimento nel trasporto polare delle auxine nell'abscissione, C270 (ciclina T1) trovato in cortex, P204 (Staygreen 1), da peduncolo, utile per discriminare fenomeni di senescenza indotti da BA dai reali effetti dell'abscissione e S035 (putativa beta galattosidasi) da seme.

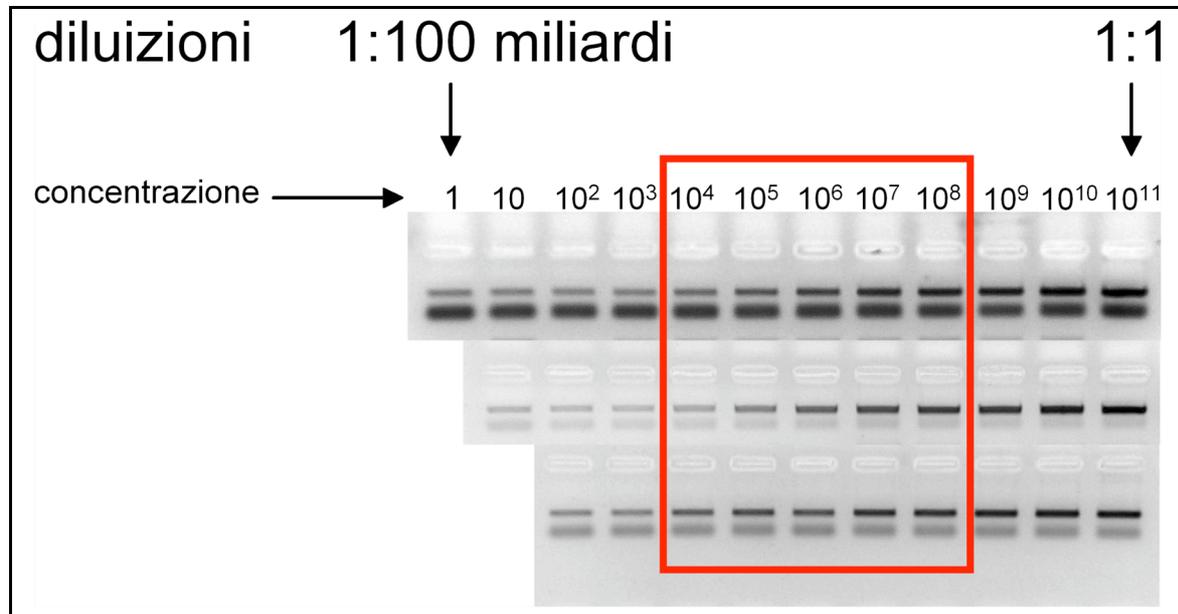
Sono stati disegnati primer selettivi (Tabella 2.3) per i suddetti geni allo scopo di condurre le prove di espressione a temperature di appaiamento comprese tra 60 e 64 °C e con amplicone di dimensione compresa tra 110 e 200 pb così da massimizzare l'efficienza di amplificazione. Tutte le coppie di primer sono risultate specifiche producendo prodotti di amplificazione unici che sono stati subclonati e successivamente sequenziati come controllo.

**Tabella 3.1: geni selezionati per le analisi di espressione.**

| Clone | Gene in <i>A. thaliana</i>                                | Numero di accesso | Specie #2                      | Gene in specie #2                             | Numero di accesso |
|-------|-----------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| C031  | big (dark over-expression of cab 1)                       | AAM77595          | <i>Medicago truncatula</i>     | Putative zinc finger in N-recognin            | ABD33330          |
| C112  | nonspecific UDP-sugar pyrophosphorylase                   | NP_568775         | <i>Pisum sativum</i>           | UDP-sugar pyrophosphorylase                   | AB178642          |
| C014  | SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha KIN10 | AAQ56829          | <i>Cucumis sativus</i>         | SNF1-related protein kinase                   | Y10036            |
| C160  | glycosyl hydrolase family 17 protein                      | NP_172647         | <i>Oryza sativa</i>            | putative beta-1,3-glucanase                   | XM_478343         |
| C213  | putative glucan synthase                                  | NP_850178         | <i>Oryza sativa</i>            | putative callose synthase 1 catalytic subunit | AP005750          |
| C270  | At1g17345                                                 | ABG48453          | <i>Medicago truncatula</i>     | cyclin T1                                     | AAR01224          |
| P204  | At4g11910                                                 | AY850161          | <i>Lycopersicon esculentum</i> | STAY GREEN                                    | AAAY98500         |
| P306  | putative aspartyl protease                                | AAF26986          | <i>Medicago truncatula</i>     | Eukaryotic aspartyl protease                  | AC148171          |
| S020  | sugar transporter, putative                               | NP_850964         | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Putative sugar transporter                    | AJ278765          |
| S035  | AT5G56870                                                 | NP_200498         | <i>Malus domestica</i>         | probable beta-galactosidase                   | BGAL_MALDO        |

Per l'analisi di PCR semiquantitativa sono state ricavate rette di taratura dall'amplificazione, con lo stesso numero di cicli, di plasmidi ad inserto noto. Ciò ha consentito di individuare la relazione tra quantità di template iniziale nelle reazioni di PCR e quantità di fluorescenza emessa dal prodotto amplificato corso su gel di agarosio con etidio bromuro. Le concentrazioni del plasmide sono state considerate come unità arbitrarie di massa. I fattori di diluizione utili per poter

distinguere differenze nella fluorescenza delle bande analizzate sono compresi tra  $10^4 \times - 10^8 \times$  (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** taratura su plasmidi diversi con inserto noto. Le diluizioni seriali dei plasmidi (da 1:1 a 1:100 miliardi) sono state utilizzate come template per amplificazione allo stesso numero di cicli (22). La concentrazione del template più diluito (1:10<sup>11</sup>) è stata considerata uguale a 1x, quella del template non diluito (1:1) è stata considerata uguale a 10<sup>11</sup>x. Nel riquadro rosso sono evidenziate le concentrazioni per le quali i prodotti finali di PCR mostrano differenze di fluorescenza evidenti.

Grazie alla calibrazione con questo sistema è stato possibile ricavare l'equazione matematica che mette in relazione la fluorescenza emessa dai prodotti di amplificazione e la concentrazione del template di partenza.

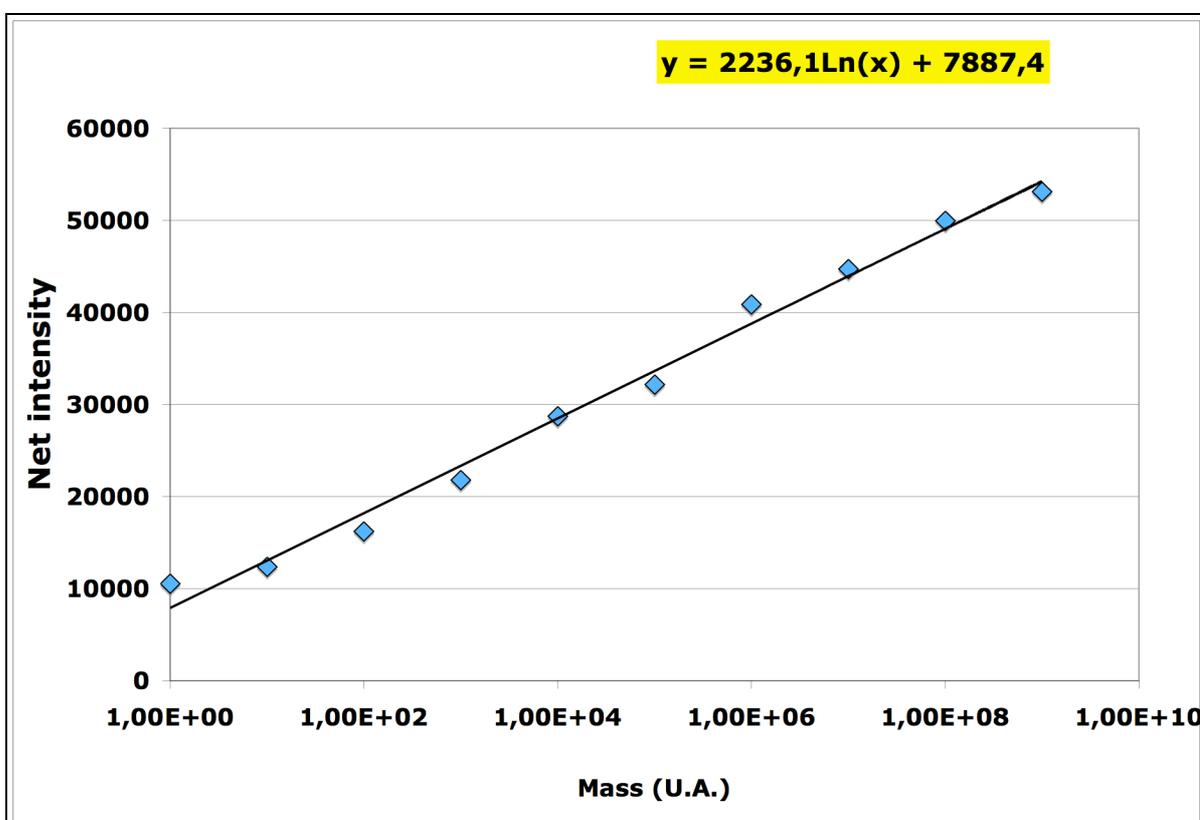
La relazione può essere approssimata alla seguente equazione:

$$ve = e^{\left(\frac{ni-k}{2236.1}\right)}$$

dove  $ve$  = valore di espressione,  $ni$  = net intensity (valore di misurazione della fluorescenza con il software KODAK 1D, espresso come intensità netta della banda analizzata: intensità della banda con sottrazione dell'intensità di fondo dovuta alla

fluorescenza dell'etidio bromuro nel gel),  $k =$  costante (uguale per tutti i campioni considerati e pari a  $k = 7887.4$ ) (Figura 3.3).

Successivamente è stato possibile applicare l'equazione suddetta a tutti i valori di intensità netta misurati con il software KODAK 1D dai gel di agarosio. In questo modo sono stati trovati dei valori di espressione del prodotto finale di amplificazione, in unità arbitrarie, che hanno permesso di discriminare grandi e piccole differenze di espressione altrimenti non apprezzabili con una semplice analisi densitometrica dei gel.

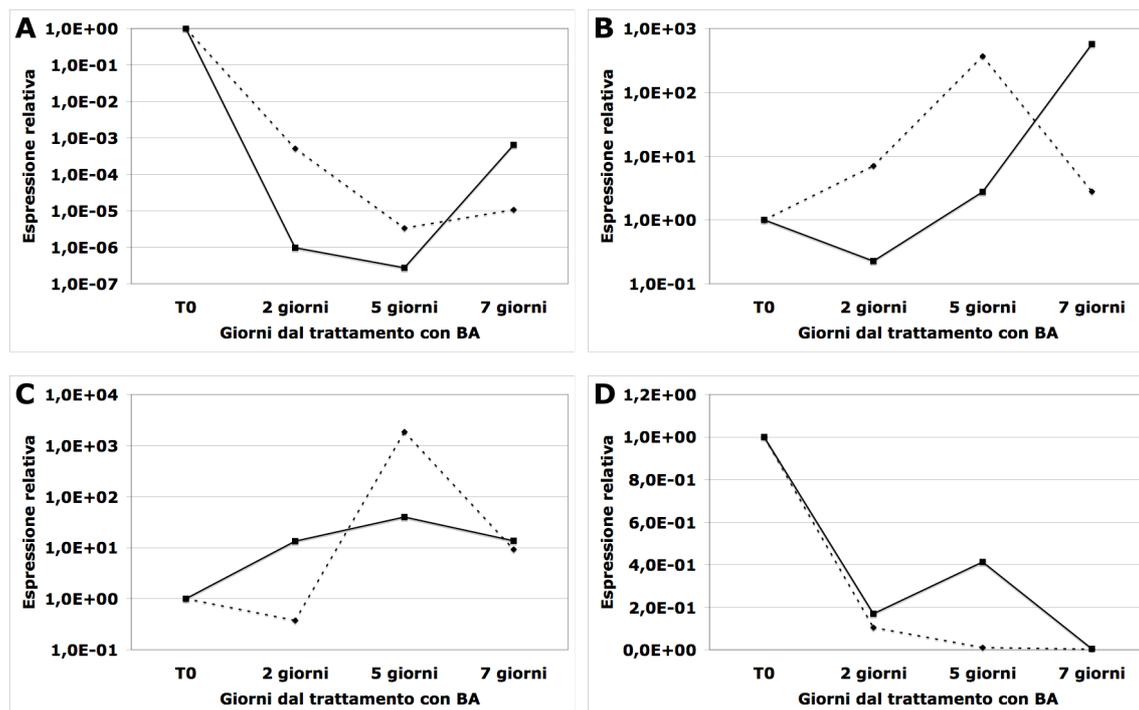


**Figura 3.3: interpolazione della media dei valori delle rette di taratura. Nell'asse delle ascisse le diverse concentrazioni di plasmide (unità arbitrarie di massa). Nell'asse delle ordinate i valori di intensità netta individuati dal software KODAK 1D. In giallo l'equazione della retta di interpolazione.**

### **3.3.2 Geni coinvolti nel metabolismo degli zuccheri e differenzialmente espressi**

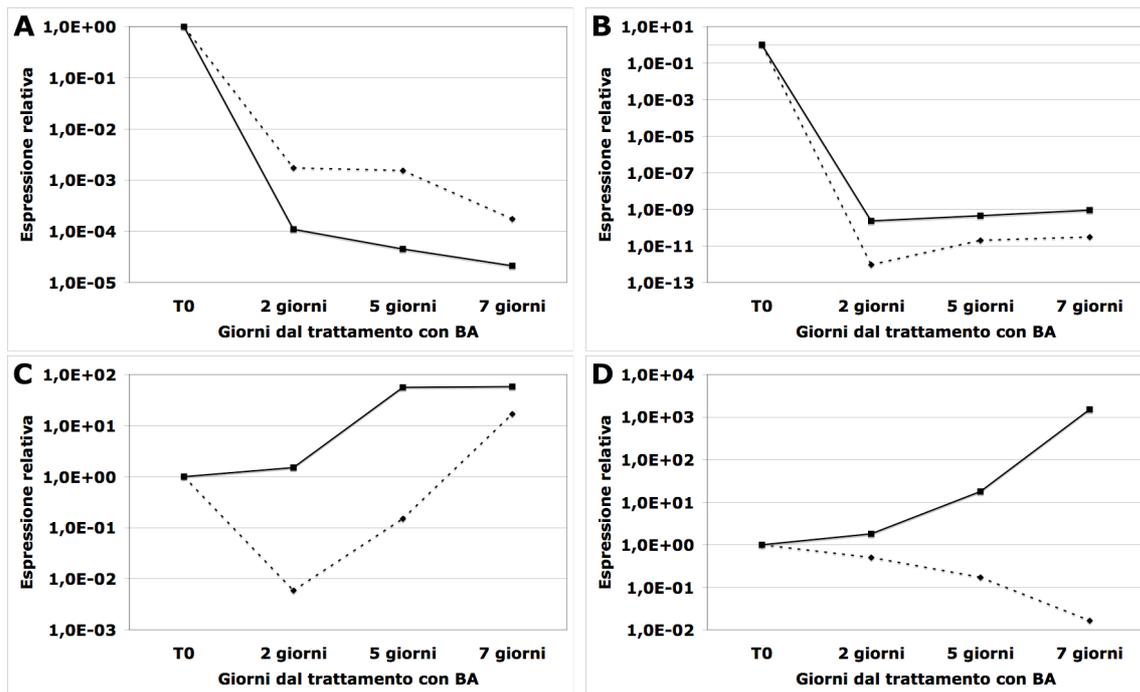
L'espressione differenziale nelle popolazioni abscendenti vs non abscendenti di EST codificanti per proteine ed enzimi coinvolti nel metabolismo degli zuccheri conferma le attuali teorie sulla regolazione dell'abscissione in melo, che vedono nel mancato equilibrio metabolico tra frutto centrale, frutti laterali e germoglio laterale, la causa dell'attivazione delle zone di abscissione. Gli zuccheri, richiesti per lo sviluppo, e gli ormoni prodotti dal seme e dal frutto sono fattori principali dell'equilibrio metabolico del corimbo.

Il clone S020 (numero di accesso DY241926), codificante per un trasportatore degli zuccheri ERD6-like coinvolto nella mobilitazione di carboidrati durante la protezione da freddo e stress (Kiyosue et al., 1998), è apparso chiaramente espresso in maniera differenziale in cortex, peduncolo e semi fin dal secondo giorno dopo il trattamento con BA (Figura 3.4), mentre la differenza di espressione nelle zone di abscissione tra la popolazione abscendente e quella non abscendente è risultata alta solo al quinto giorno dopo il trattamento. L'elevata espressione di questo gene nei frutti abscendenti potrebbe essere legata alla riallocazione degli zuccheri non più utili ai frutticini destinati ad abscindere.



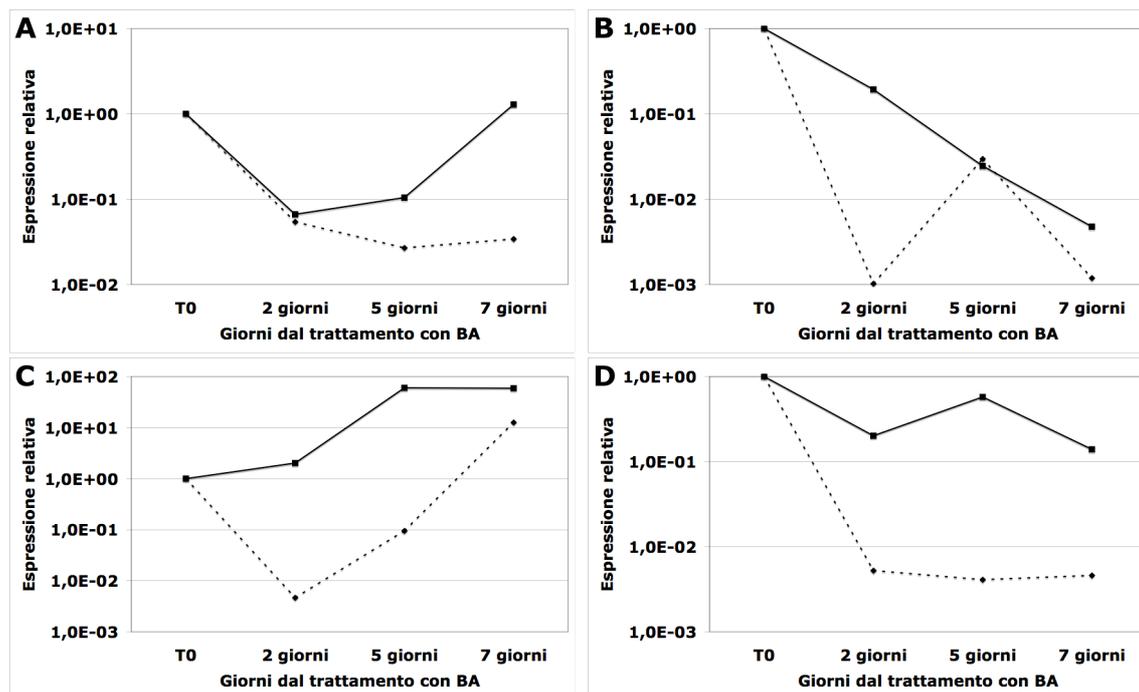
**Figura 3.4: Espressione del clone S020 (numero di accesso DY241926), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscidenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscidenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.**

Il clone C112 (numero di accesso DY241991) è codificante per una UDP-galattosio/glucosio pirofosforilasi (UDP-N-Acetylglucosammina pirofosforilasi like), proteina localizzata nel sistema di endomembrane che catalizza l'interconversione tra i monosaccaridi 1-fosfato e i rispettivi derivati UDP-glucosidici (Litterer et al., 2006). Il trascritto si mantiene allo stesso livello nei peduncoli di frutti abscidenti e non abscidenti, è sovraespresso nella cortex degli AF e sottoespresso in semi e zone di abscissione di frutti abscidenti. E' interessante l'andamento di espressione completamente opposto nelle zone di abscissione delle due popolazioni di frutticini. Mentre nelle AZ dei frutti persistenti il trascritto aumenta, in quella dei frutti abscidenti la quantità di trascritto diminuisce, indice di un rallentamento dell'attività metabolica degli zuccheri nei frutti destinati ad abscindere (Figura 3.5).



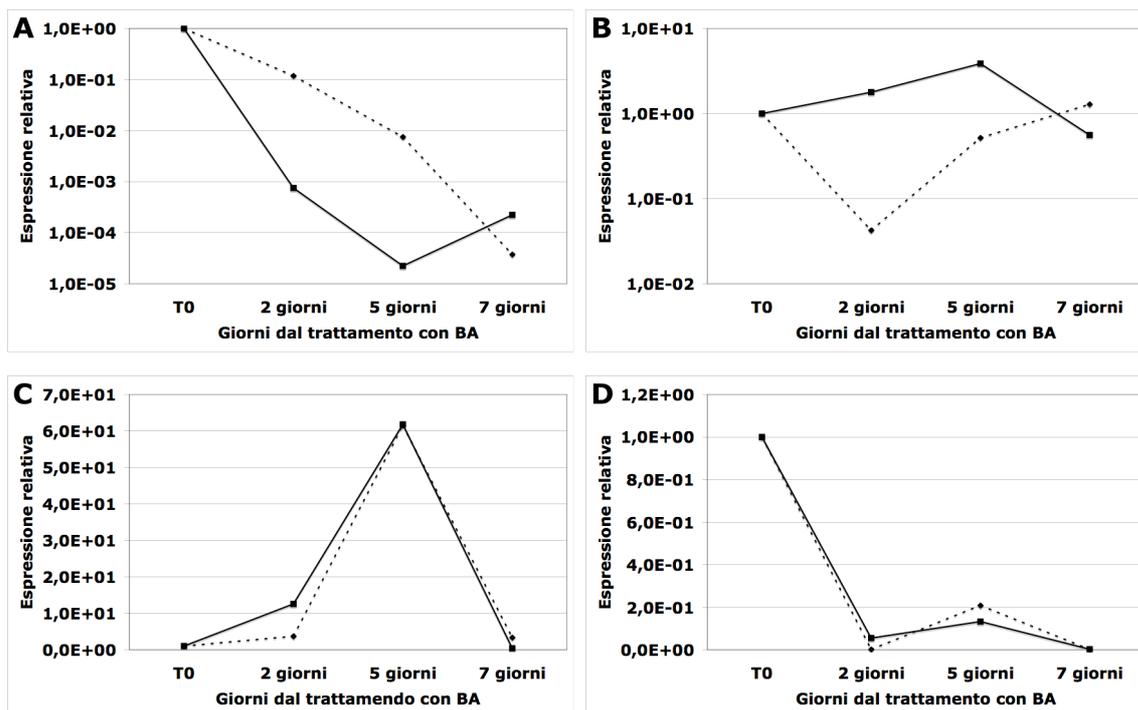
**Figura 3.5: grafici dell'espressione del clone C112 (numero di accesso DY241991), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.**

Il clone C114 (numero di accesso DY242000) codifica per una chinasi serina/treonina del tipo SNF1, proteina chiave nel metabolismo degli zuccheri in piante, lieviti e animali (Halford et al., 2003; Polge and Thomas, 2007). Il gene è apparso maggiormente espresso in cortex, semi e peduncoli nei frutticini non abscindenti. Nei peduncoli delle due popolazioni c'è una grande differenza di espressione dopo due giorni dal trattamento con un calo negli AF, ma in seguito il trascritto torna a livelli comparabili a quello dei NAF (Figura 3.6). La regolazione negativa di questo gene nei frutti abscindenti, come per il precedente, potrebbe essere indicativa del rallentamento della crescita dei frutticini trattati e del rallentamento del metabolismo cellulare e della necessità di zuccheri.



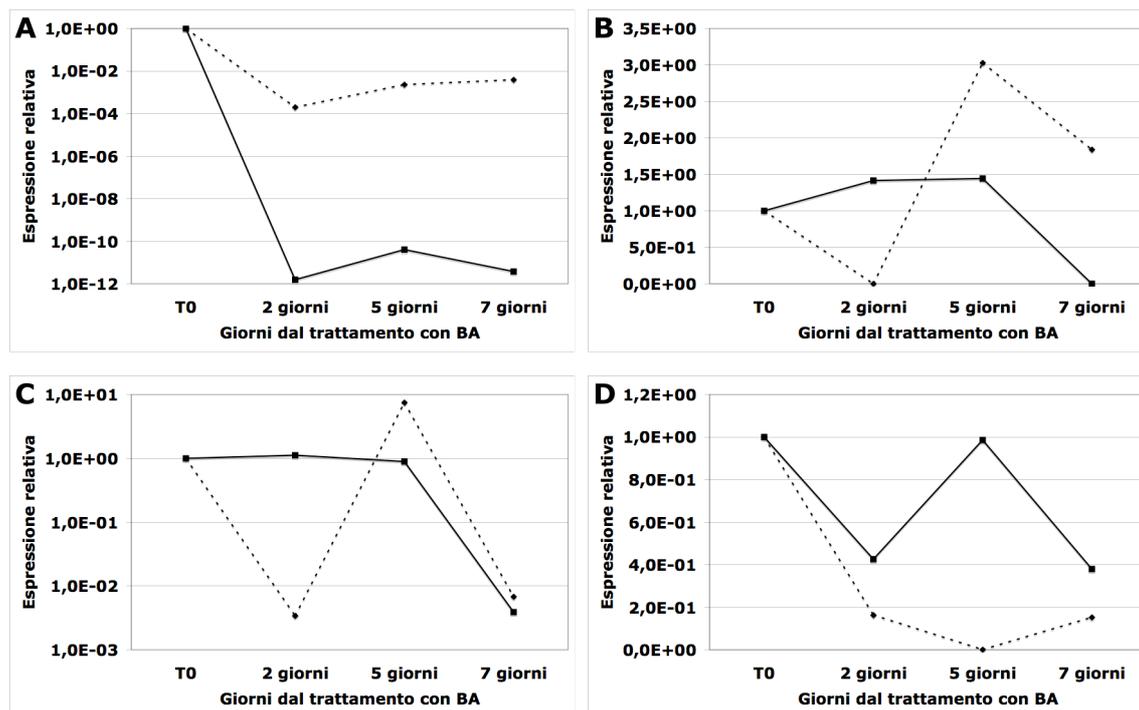
**Figura 3.6: espressione del gene C114 (numero di accesso DY242000), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.**

Il trascritto del clone C160 (numero di accesso DY242020), codificante per una glicosil idrolasi della famiglia 17, ha mostrato una chiara espressione differenziale in cortex e peduncolo, con una sovraespressione nella cortex dei frutti abscindenti. Al settimo giorno dopo il trattamento l'espressione è tornata allo stesso livello registrato nei frutti di controllo. Nei semi e nelle zone di abscissione non sono state riscontrate differenze di espressione di questo gene tra le due popolazioni (Figura 3.7).



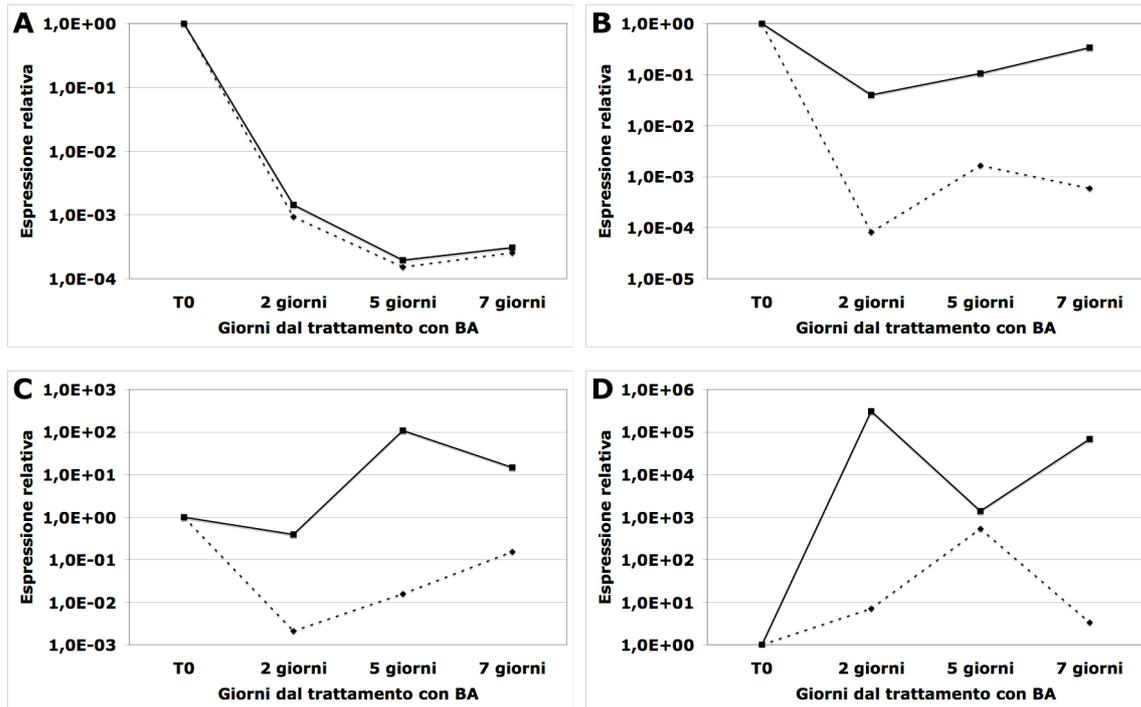
**Figura 3.7:** grafici dell'espressione del clone C160 (numero di accesso DY242020), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.

Il clone C035 (numero di accesso DY241917) codificante per un precursore della  $\beta$ -galattosidasi, sovraespresso in cortex dei frutti abscindenti, e sottoespresso nelle zone di abscissione degli stessi frutti (Figura 3.8), è putativamente responsabile della degradazione della parete cellulare ed è, solitamente, responsabile del rammollimento del frutto durante la maturazione (Ross et al., 1994).



**Figura 3.8:** grafici dell'espressione del clone C035 (numero di accesso DY241917), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.

La differenza di espressione del clone C213 (numero di accesso DY242101), callosio sintasi (Cals1), è risultata nulla in cortex, mentre il gene è apparso negativamente regolato in semi, peduncoli e zone di abscissione dei frutticini abscindenti (Figura 3.9). Questo gene è associato alla formazione del fragmoplasto e una sua sottoespressione potrebbe indicare un rallentamento della divisione cellulare (Verma and Hong, 2001).



**Figura 3.9:** grafici dell'espressione del clone C213 (numero di accesso DY242101), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.

### 3.3.3 Andamenti dell'espressione dei geni del metabolismo proteico

Il clone P306 (numero di accesso DY242118) che codifica una aspartil proteasi, è risultato differenzialmente espresso in tutti i campioni e in particolare, sottoespresso in peduncoli, semi e zone di abscissione di frutti abscidenti. In cortex è stata riscontrata un'espressione differenziale tra le due popolazioni solo dopo due giorni il trattamento (Figura 3.10).

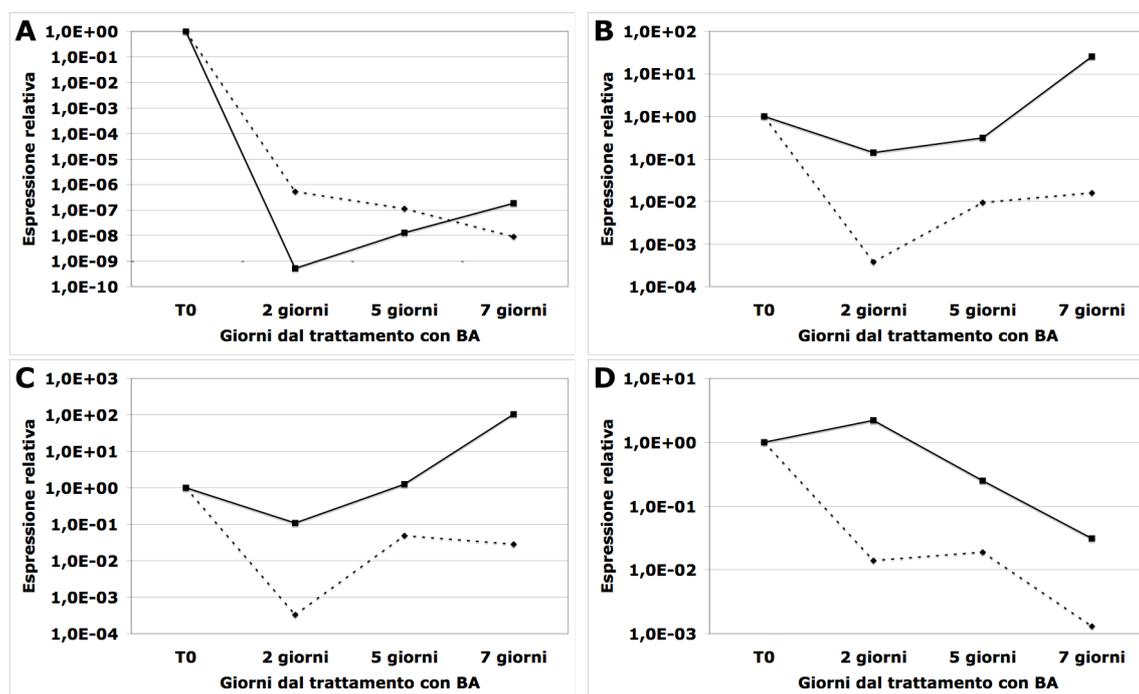
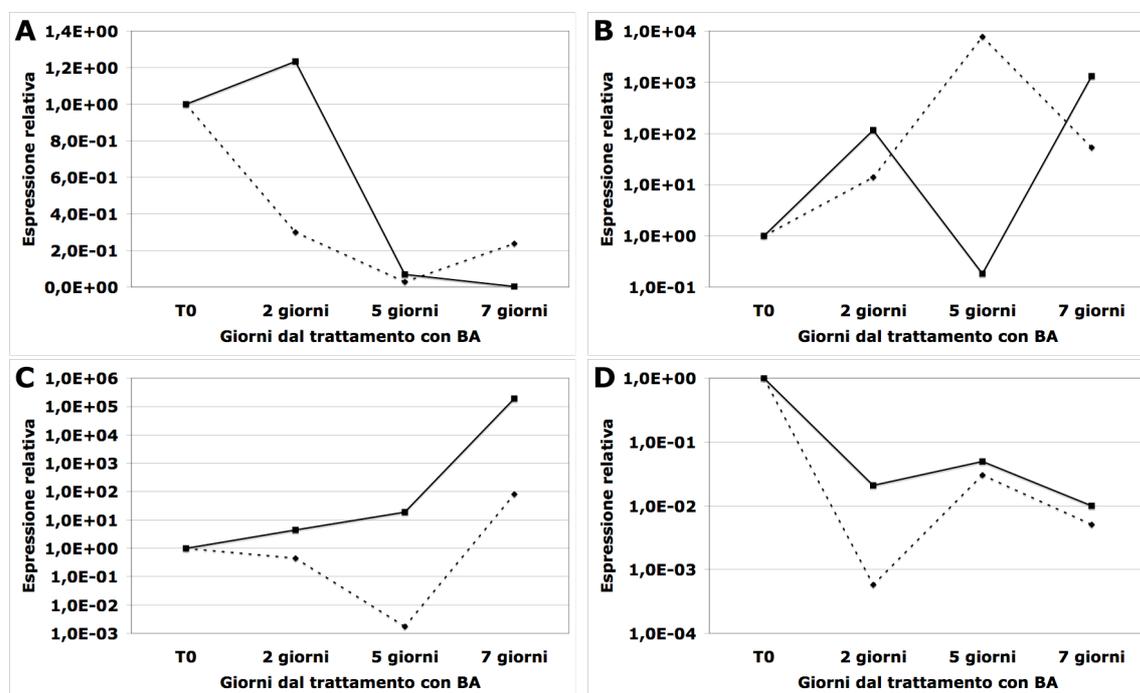


Figura 3.10: grafici dell'espressione del clone P306 (numero di accesso DY242118), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscidenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscidenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.

### 3.3.4 Espressione di geni deputati al mantenimento del cloroplasto

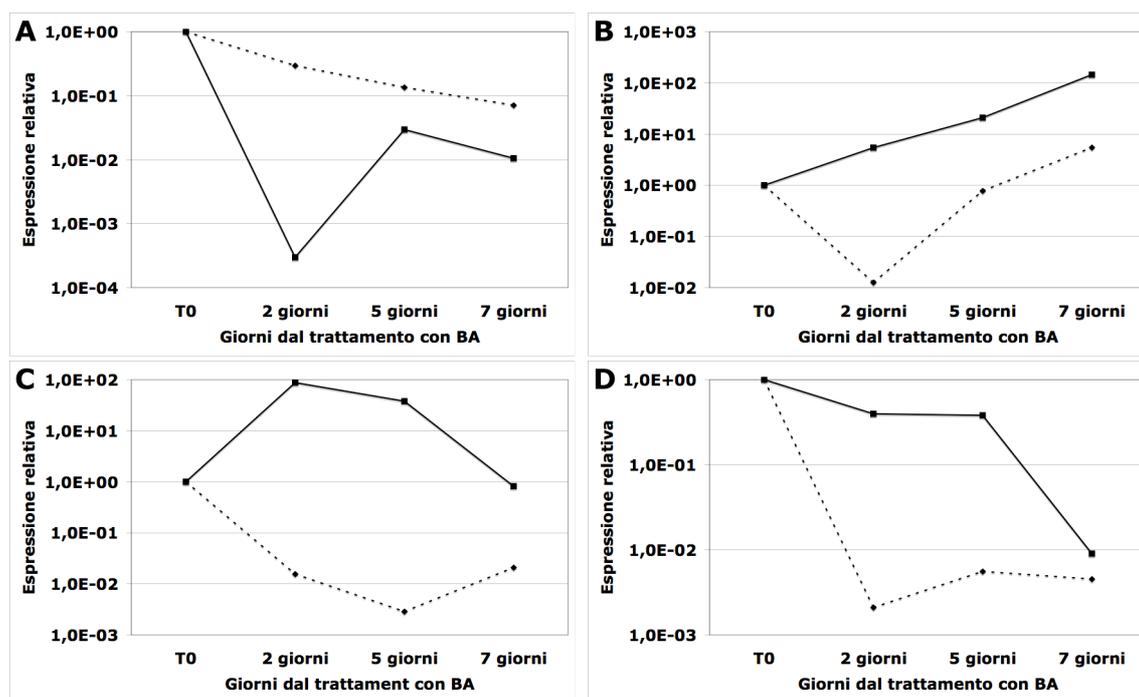
La quantità di trascritto del gene Staygreen1, clone P204 (numero di accesso DY242172) è risultata molto minore nella cortex, come anche nelle zone di abscissione dei frutticini abscidenti (dopo due giorni dal trattamento) e nei semi (durante tutto il periodo successivo al trattamento con BA). In peduncolo, l'andamento dell'espressione genica è risultato completamente opposto tra le due popolazioni, con un riavvicinamento della quantità di trascritto dopo otto giorni dal trattamento (Figura 3.11).



**Figura 3.11: grafici dell'espressione del clone P204 (numero di accesso DY242172), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscidenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscidenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.**

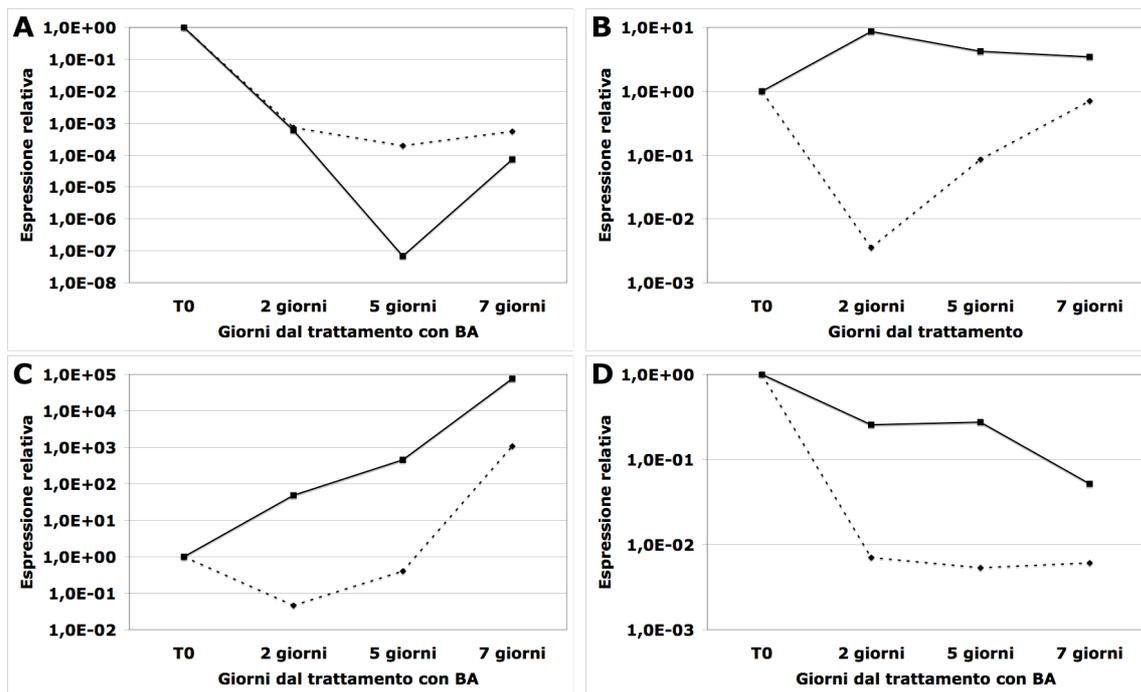
### 3.3.5 Espressione di geni coinvolti nel metabolismo e trasduzione del segnale delle auxine

Il gene BIG, codificante per una proteina calossin-like (dark overexpression of CAB1) coinvolta nel trasporto polare dell'auxina, clone C031 (numero di accesso DY241972), è differenzialmente espresso in tutti i tessuti, in particolare è sottoespresso in semi, peduncolo e zone di abscissione ed è sovraespresso nella cortex dei frutticini abscidenti (Figura 3.12). La differenza di espressione di questo gene tra le due popolazioni indica che il trasporto polare delle auxine è disturbato, in particolare potrebbe essere rallentato in peduncoli, semi e zone di abscissione dei frutti abscidenti dove l'induzione all'abscissione da parte dell'etilene non viene contrastata dall'auxina.



**Figura 3.12:** grafici dell'espressione del clone C031 (numero di accesso DY241972), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscidenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscidenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.

Il clone C270 (numero di accesso DY242125), omologo di una ciclina T1 in *Medicago truncatula* e di un gene contenente elementi auxin-responsive in *Arabidopsis thaliana* è sottoespresso in peduncoli, semi e zone di abscissione di frutti abscindenti, mentre nella cortex il livello di espressione di differenzia dopo il quinto giorno dal trattamento, con un aumento minimo nei frutti abscindenti 7 giorni dopo il trattamento (Figura 3.13).



**Figura 3.13: grafici dell'espressione del clone C270 (numero di accesso DY242125), in cortex (A), peduncolo (B), semi (C) e zone di abscissione (D). La linea tratteggiata indica l'espressione nei frutti della popolazione AF (abscindenti) e la linea continua indica l'espressione nei frutti della popolazione NAF (non abscindenti). Sull'asse delle ascisse i giorni dal trattamento con BA avvenuto in corrispondenza del T0 e sull'asse delle ordinate il valore relativo di espressione.**

### **3.4 Analisi e studio di geni di *Arabidopsis* omologhi a quelli associati all'abscissione in melo**

#### **3.4.1 Valutazione e ricerca di fenotipi per abscissione disturbata in mutanti di *Arabidopsis***

Per una ulteriore validazione dei geni isolati in melo e coinvolti nell'abscissione, si è proceduto ad isolare dei mutanti inserzionali che consentissero di studiare l'effetto di una perdita di funzione di tali geni sul processo di abscissione in generale.

Sono stati selezionati 24 geni putativamente coinvolti nel processo di abscissione in *Malus domestica* e sono stati scelti i relativi omologhi in *Arabidopsis* (Tabella 3). Sono state quindi ordinate presso l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, The Ohio State University, Columbus, OH, USA) le linee Salk di *Arabidopsis thaliana* var. Columbia con inserzioni T-DNA nei geni suddetti.

Per ogni linea Salk sono stati disegnati primer specifici per la genotipizzazione e le analisi del trascritto con PCR semiquantitativa. Successivamente le piante di *Arabidopsis* della generazione T1, fatte crescere in condizioni controllate, sono state genotipizzate per individuare i knock-out omozigoti per i geni scelti. Le analisi di espressione, condotte sulle linee omozigoti per l'inserzione, hanno confermato l'assenza di trascritto dei i geni silenziati.

E' stato possibile ottenere piante omozigoti di 17 linee Salk (Tabella 3.2) che sono state analizzate per ricercare fenotipi relativi a disturbi dell'abscissione dei petali (accelerata, ritardata o assente) senza esito positivo.

Inoltre non sono stati osservati fenotipi riguardanti lo sviluppo della pianta tranne che per le linee salk\_105495, allele di big-1, con una inserzione di T-DNA nel decimo esone del gene BIG (At3g02260), e salk\_015237, corrispondente all'allele big-4, con una inserzione di T-DNA nel terzo esone del gene BIG. Entrambi gli alleli hanno mostrato un fenotipo nano chiaramente legato ad un disturbo nel trasporto auxinico, ma le piante mature non hanno mostrato alcuna differenza

nell'abscissione dei petali rispetto al fenotipo selvatico *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. Il fenotipo di entrambi gli alleli è già stato caratterizzato (Burget et al., 2003; Gil et al., 2001; Kasajima et al., 2007; Tamura et al., 2005).

La linea salk\_015237 come anche la salk\_105495 hanno presentato un fenotipo nano, con una crescita molto rallentata ed uno stadio giovanile prolungato (Figura 3.14). Inoltre le piante in fase di senescenza hanno mostrato una alta produzione di antocianine e una produzione eccessiva di steli laterali. Non sono stati osservati fenomeni di ritardo o mancanza di abscissione.

La linea salk\_127057 con una inserzione di T-DNA nel primo esone del gene MUR3 (At2g20370), ha mostrato un evidente fenotipo legato al disturbo dello sviluppo dovuto alla interruzione della funzionalità del gene MURUS3 e quindi della proteina di membrana del Golgi responsabile per la normale organizzazione delle endomembrane e dell'allungamento cellulare (Darley et al., 2001). Le piante mostrano nanismo, accrescimento ridotto dell'infiorescenza, malformazione fogliare con un'evidente clorosi, ma nessun fenotipo per quanto riguarda l'abscissione dei petali (Figura 3.14).

Inoltre, ulteriori osservazioni al microscopio elettronico ESEM (environmental scanning electron microscope) delle zone di abscissione di tutti i mutanti nelle diverse posizioni fiorali non hanno fornito alcuna evidenza di un cambiamento dello sviluppo della zona di abscissione a livello microscopico (Figura 3.15).

**Tabella 3.2: lista dei geni di *Arabidopsis* omologhi a quelli associati all'abscissione identificati in melo e relative linee salk analizzate. E' indicata la posizione del T-DNA nel gene e l'ottenimento di omozigoti o eterozigoti.**

| Clone | BLAST                                                                                  | AT-CODE   | Linea Salk  | Posizione Inserzione | OM. | ET. |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------------|-----|-----|
| C160  | GLYCOSYL HYDROLASE FAMILY 17                                                           | At1g11820 | SALK_087126 | UTR5                 |     |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_119494 | promotore            | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_066140 | esone                | X   |     |
| C213  | CALLOSE SYNTHASE/GLUCAN SYNTHASE                                                       | At2g31960 | SALK_011560 | esone                |     |     |
| P306  | PUTATIVE ASPARTYL PROTEASE - PEPSIN A                                                  | At3g02740 | SALK_030509 | promotore            | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_030510 | promotore            |     |     |
| S020  | SUGAR/CARBOHYDRATE TRANSPORTER                                                         | At1g54730 | SALK_047700 | introne              |     |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_034462 | introne              |     |     |
| S035  | PROBABLE B-GALACTOSIDASE                                                               | At5g56870 | SALK_022796 | esone                | X   |     |
| C114  | SNRK1 - SUCROSE NON FERMENTING RELATED KINASE 1                                        | At3g01090 | SALK_127939 | esone                |     | X   |
|       |                                                                                        |           | SALK_052855 | promotore            | X   |     |
| P204  | SENESCENCE INDUCIBLE CHLOROPLAST STAY GREEN1                                           | At4g22920 | SALK_070891 | promotore            | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_151990 | promotore            | X   |     |
| C051  | UDP GLUCOSE-STEROL GLYCOSYL TRANSFERASE                                                | At3g07020 | SALK_020939 | esone                | X   |     |
| C014  | BET1 LIKE - SNARE                                                                      | At3g58170 | SALK_150636 | introne              | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_135787 | UTR5                 |     |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_117736 | promotore            |     | X   |
| C031  | BIG - POLAR AUXIN TRANSPORT                                                            | At3g02260 | SALK_105495 | esone                | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_015237 | esone                | X   |     |
| C270  | CYCLIN T1 - AUXIN RESPONSE PROTEIN                                                     | At1g17345 | SALK_059685 | esone                |     | X   |
|       |                                                                                        |           | SALK_117359 | promotore            | X   |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_112785 | promotore            |     |     |
| P312  | SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE                                                  | At1g71830 | SALK_044330 | esone                |     |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_080572 | promotore            |     |     |
|       |                                                                                        |           | SALK_053021 | esone                |     | X   |
| C135  | RHM1 - PROBABLE RHAMNOSE BIOSYNTHETIC ENZYME 1                                         | At1g78570 | SALK_097839 | promotore            |     | X   |
|       |                                                                                        |           | SALK_143589 | promotore            |     |     |
| K106  | OXOGLUTARATE/MALATE ANTIporter                                                         | At5g12860 | SALK_152687 | UTR5                 | X   |     |
|       | protein kinase, putative, similar to protein kinase APK1A                              | At3g01300 | SALK_084594 | UTR5                 | X   |     |
|       | protein kinase, putative, similar to auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase | At2g05940 | SALK_089068 | UTR3                 |     | X   |
|       | Serine/threonine protein kinase similar to protein kinase APK1A                        | At3g28690 | SALK_007970 | introne              |     |     |
|       | serine threonine-specific protein kinase NAK                                           | At5g01020 | SALK_044339 | UTR5                 | X   |     |

| <b>Clone</b> | <b>BLAST</b>                                              | <b>AT-CODE</b> | <b>Linea Salk</b> | <b>Posizione Inserzione</b> | <b>OM.</b> | <b>ET.</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|------------|------------|
|              | protein kinase, putative, similar to protein kinase APK1A | At5g02290      | SALK_115670       | esone                       |            |            |
|              | protein kinase, putative, similar to protein kinase APK1A | At2g17220      | SALK_113804       | esone                       |            |            |
|              | protein kinase, putative, similar to protein kinase APK1A | At5g15080      | SALK_067743       | esone                       |            |            |
|              | protein kinase, putative, contains protein kinase domain  | At2g07180      | SALK_135661       | esone                       | X          |            |
|              |                                                           |                | SALK_135660       | esone                       |            |            |
|              | protein kinase, putative, similar to protein kinase       | At5g47070      | SALK_003633       | esone                       | X          |            |

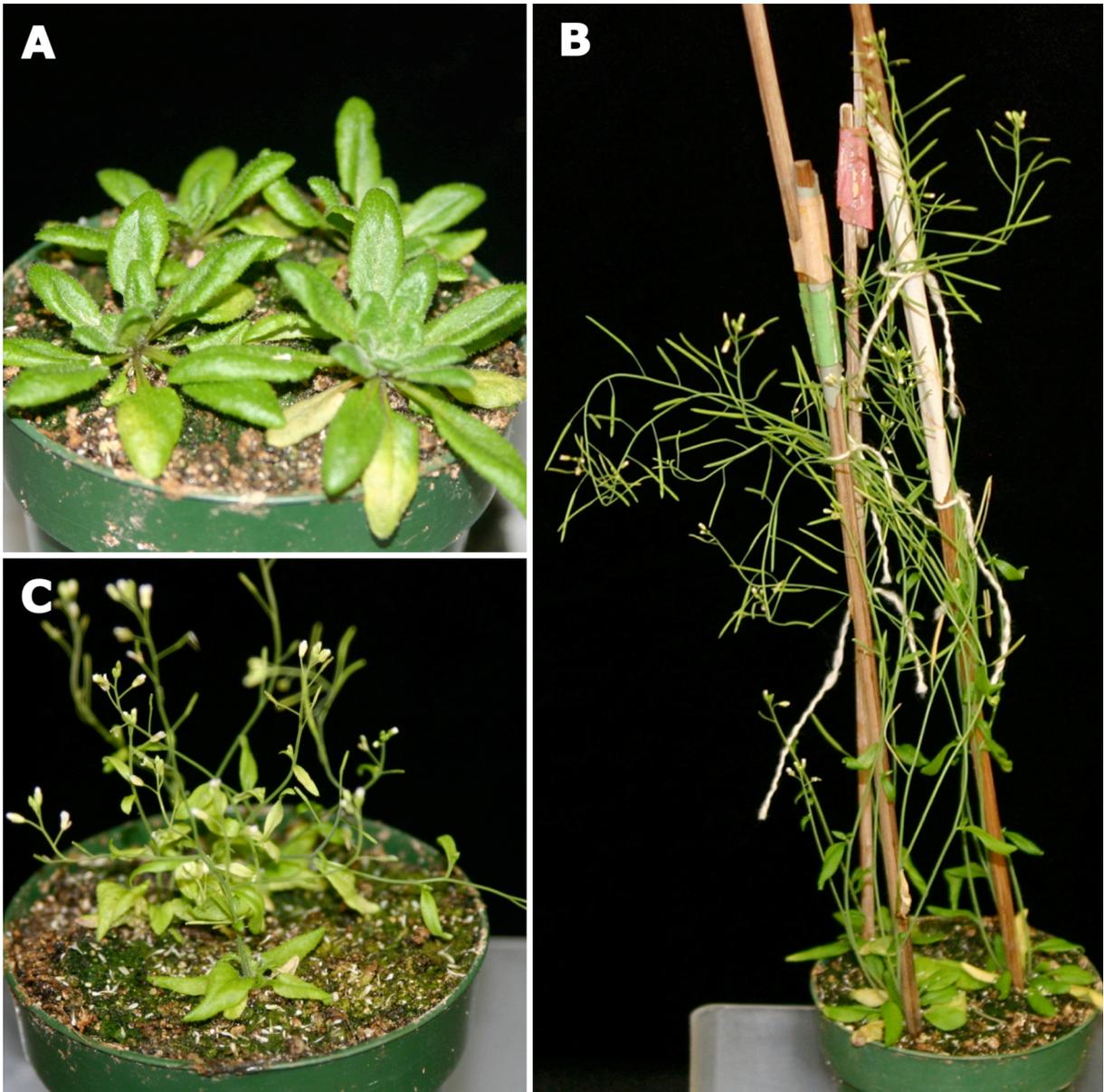
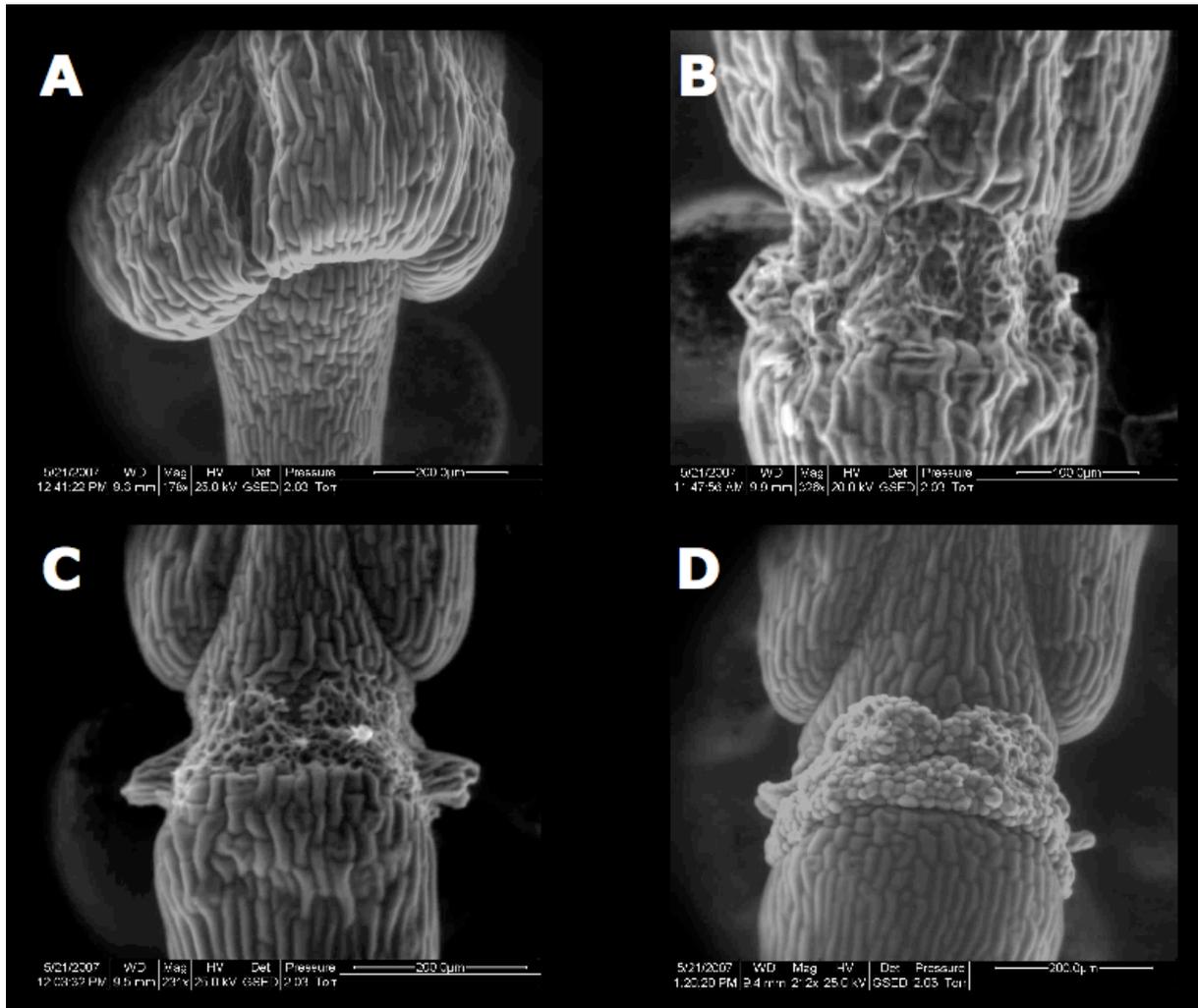


Figura 3.14: Immagini esemplificative di *Arabidopsis thaliana* alla stessa età di sviluppo. A, mutante *BIG* con evidente nanismo e crescita rallentata. B, *wild type* Columbia. C, mutante *MUR3* con nanismo e accrescimento disturbato delle strutture della pianta a causa dei disturbi nella formazione della parete cellulare.



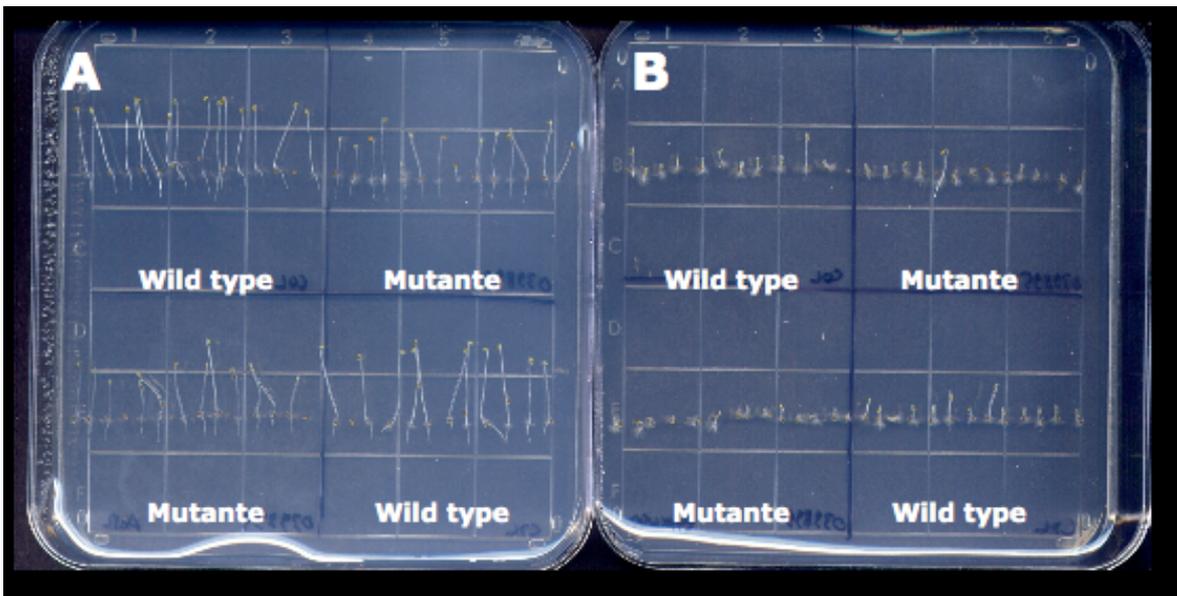
**Figura 3.14: zone di abscissione di *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia* visualizzate al microscopio elettronico a scansione ESEM. A, fiore, in posizione fiorale 1, con sepali e petali. B, fiore con petali rimossi forzatamente in posizione fiorale 4. C, zona di abscissione con petali caduti naturalmente in seguito ad abscissione in posizione fiorale 7. D, zona di abscissione con cellule dalla caratteristica forma globulare in seguito a cicatrizzazione della ferita in posizione fiorale 10.**

### 3.4.2 Trattamenti con etilene

Tutte le linee mutanti in seguito sono state sottoposte a trattamenti con etilene, in condizioni controllate a 0,6 ppm con relativo controllo in aria, al fine di verificare una eventuale accentuazione nell'abscissione rispetto alle piante selvatiche e per verificare ulteriori differenze in termini di risposta alla senescenza indotta dal trattamento. Tutte le piante trattate con etilene hanno mostrato una

risposta normale. Sono stati valutati il distacco dei petali, avvenuto normalmente, e l'ingiallimento delle foglie della rosetta. Non sono quindi risultati evidenti cambiamenti di alcun genere, dopo tre giorni di trattamento, tra i mutanti e il controllo selvatico.

L'analisi del fenotipo in risposta al trattamento con etilene è stata effettuata anche su plantule derivanti da semi germinati su piastra. I semi mutanti sono stati fatti germinare su piastre Petri con 1/2MSNS (Murashige Skoog no-sugar) mantenute al buio in presenza di etilene a 100ppm allo scopo di evidenziare disturbi nella tripla risposta. E' stata misurata la lunghezza dell'ipocotile dopo tre giorni dall'inizio del trattamento (Figura 3.16). Le linee salk\_127057 (MUR3), e salk\_015237 (BIG), hanno mostrato una crescita minore dell'ipocotile dovuta, però, al fenotipo normalmente nano e ad una crescita rallentata, indipendente dal trattamento con etilene.



**Figura 3.16:** disposizione dei semi germinati sottoposti a trattamenti e controlli su piastre Petri con 1/2MSNS. A, controllo in aria in ambiente buio. B, trattamento con etilene in ambiente buio.

### 3.4.3 Analisi di espressione su piante mutanti *dab4-1*, *dab5-1* e *ida*

Sono stati disegnati primer per analisi di espressione con real-time RT-PCR per geni di *Arabidopsis* omologhi ai cloni individuati in melo con il cDNA-AFLP. Le analisi di espressione di questi geni sono state eseguite su cDNA retrotrascritto dall'mRNA estratto da zone di abscissione dei mutanti *dab4-1*, *dab5-1*, *ida*, Col (Columbia) e WS (Wassileskija) allo scopo di verificare un eventuale coinvolgimento di questi geni nell'abscissione.

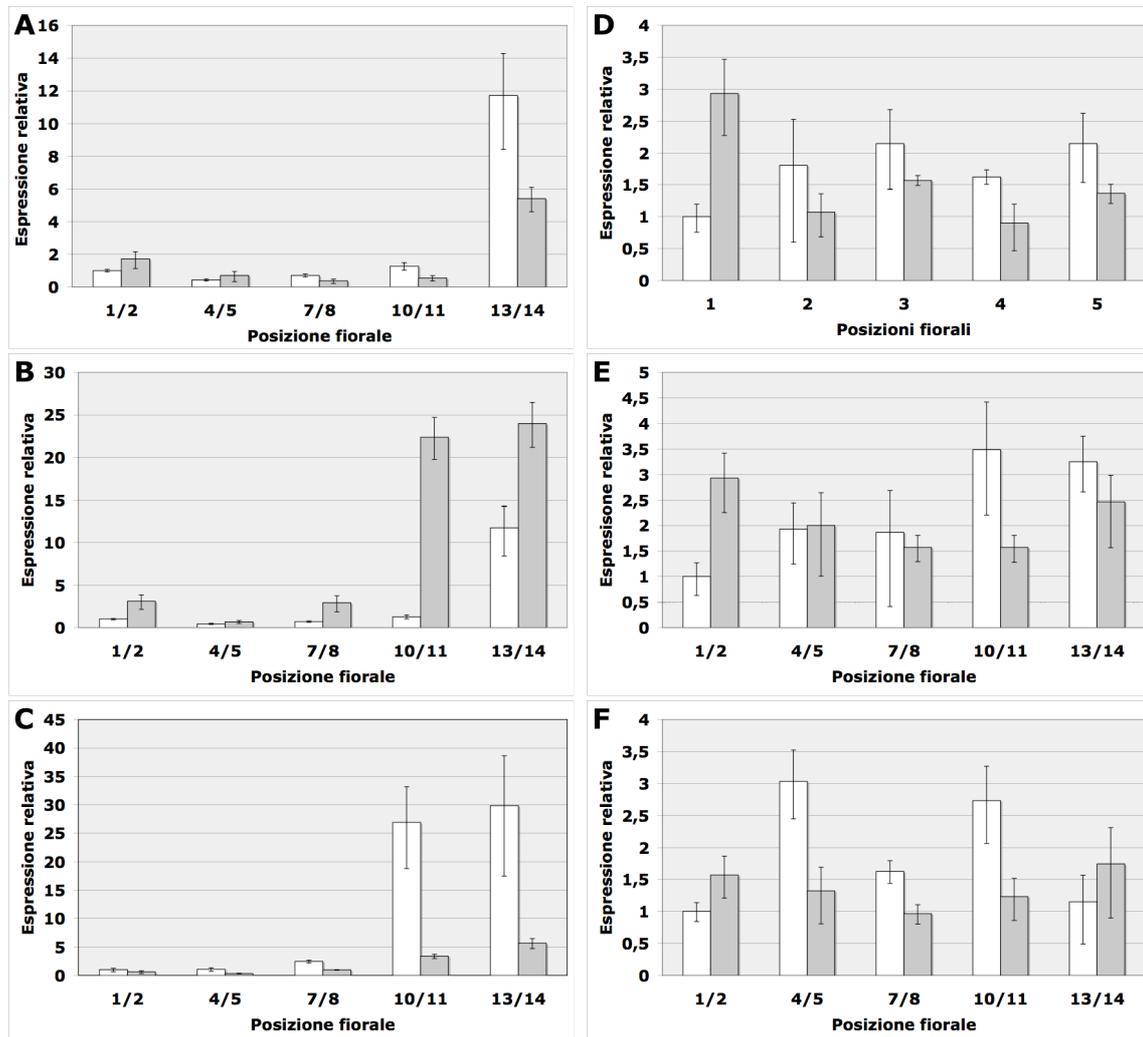
Le analisi di espressione hanno mostrato differenze di espressione dei geni nei mutanti rispetto ai controlli WS per *dab4-1* e *dab5-1* e Col per *ida*.

Il gene *Serk1* (Somatic embryogenesis receptor-like kinase 1, At1g71830) codifica per una LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase) che gioca un ruolo fondamentale nell'embriogenesi somatica, nell'apomeiosi e nella sporogenesi maschile (Albertini et al., 2005; Colcombet et al., 2005; Hecht et al., 2001). *Serk1* è anche coinvolto nella pathway trasduttiva del brassinolide (Karlova et al., 2006). È evidente come sia differenzialmente espresso nei mutanti utilizzati come anche nel wild type, in particolare dopo l'abscissione nelle posizioni fiorali 10/11 e 13/14 (Figura 3.17 A, B e C). È interessante notare come in *dab5-1* l'espressione sia risultata estremamente più alta che nel wild type e molto maggiore all'espressione negli altri due mutanti. Il gene non è direttamente correlato all'attivazione dell'abscissione, ma può comunque essere secondariamente influenzato da processi metabolici attivi dopo l'induzione dell'abscissione.

È stata presa in considerazione l'intera famiglia multigenica di *Serk1*, composta da cinque elementi. Purtroppo non è stato possibile disegnare primer per discriminare i prodotti di amplificazione dei geni *Serk2*, *Serk3* e *Serk4* che non sono stati quindi analizzati. Per quanto riguarda *Serk5* sono state condotte analisi con real-time RT-PCR che hanno dimostrato una completa assenza di trascritto nelle zone di abscissione nei tre mutanti e in tutte le posizioni fiorali (dati non mostrati).

Il gene *Bet v11* (*Bet 1 like*, At3g58170) codificante per una SNARE e omologo al clone C014 (numero di accesso DY241902) trovato in melo, ha un ruolo fondamentale nella fusione di membrane intra-cellulari e nell'orientamento delle

vescicole con relativo coinvolgimento nei meccanismi di trasporto proteico (Chatre et al., 2005) ed è sovraespresso nelle posizioni fiorali 1/2 e sottoespresso nelle restanti posizioni dei mutanti (Figura 3.17 D, E ed F). Una trascrizione più bassa di questo gene nelle zone di abscissione dei mutanti può indicare l'effettivo coinvolgimento del metabolismo vescicolare rallentato nei fiori con abscissione dei petali ritardata o assente.

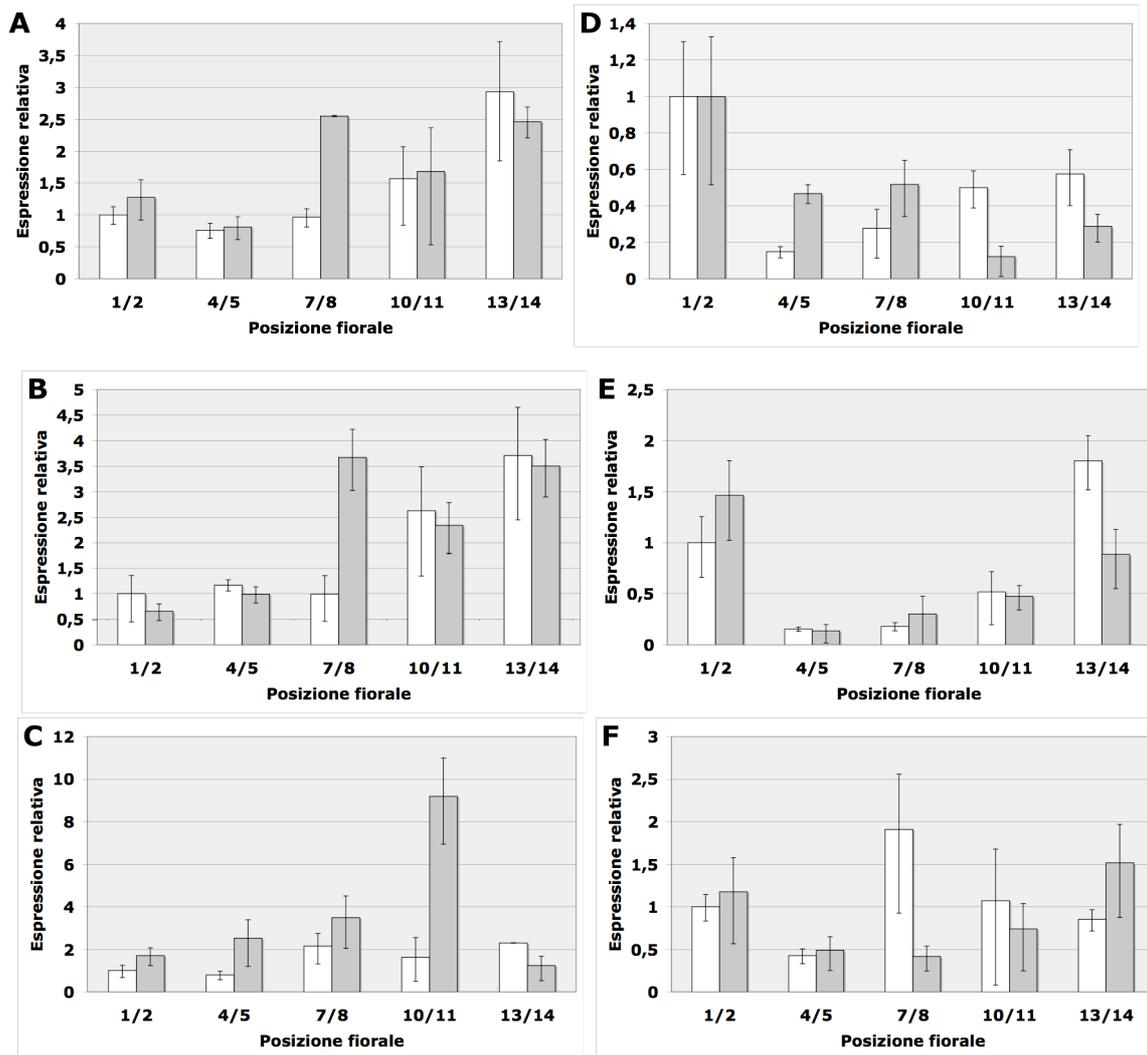


**Figura 3.16:** analisi di espressione di Serk1 (At1g71830) (A, B e C) e Bet v11 (At3g58170) (D, E e F) tramite real-time RT-PCR valutata con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Sull'asse delle ordinate l'espressione relativa, sull'asse delle ascisse la posizione fiorale. A e D, espressione dei geni nel mutante *dab4-1* e controllo WS. B ed E, espressione dei gene nel mutante *dab5-1* e controllo WS. C e F, espressione dei geni nel mutante *ida* e controllo Col.

Il gene codificante per una glicosil idrolasi ( $\beta$ -1,3-glucanasi, At1g11820), responsabile della idrolisi del legame 1,4-beta-D-glucosidico nei  $\beta$ -D-glucani contenenti legami 1,3 e 1,4 è apparso maggiormente espresso nelle posizioni 7/8 di *dab4-1* e *dab5-1* e nelle posizioni 10/11 del mutante *ida* (Figura 3.18 A, B e C). Il gene codifica per uno degli enzimi parte del sistema messo in atto dalla pianta per degradare la parete cellulare. Nonostante il livello di espressione di questo gene sia pari o superiore a quello del wild type i mutanti non abscindono, segno che non è sufficiente questo enzima e/o che la traduzione del gene non avviene in modo corretto.

Il gene AtNYE1 (Staygreen1 like, At4g22920), è stato scelto per l'impossibilità di ottenere primer specifici per Staygreen1 o Staygreen2. AtNYE1, come Staygreen1, è fondamentale per la degradazione della clorofilla durante i processi di senescenza. In particolare AtNYE1 sembra agire modulando, direttamente o indirettamente, l'attività dell'enzima feoforbide ossigenasi A responsabile dell'eliminazione dell'anello porfirinico della clorofilla (Ren et al., 2007).

In ogni caso, analogamente a Staygreen1 e 2, questo gene è regolato e attivato durante i processi di senescenza che condividono molte vie metaboliche con l'abscissione. In particolare è interessante notare la differenza di espressione tra *ida* e Col nelle posizioni fiorali 7/8 (Figura 3.18 D, E ed F).

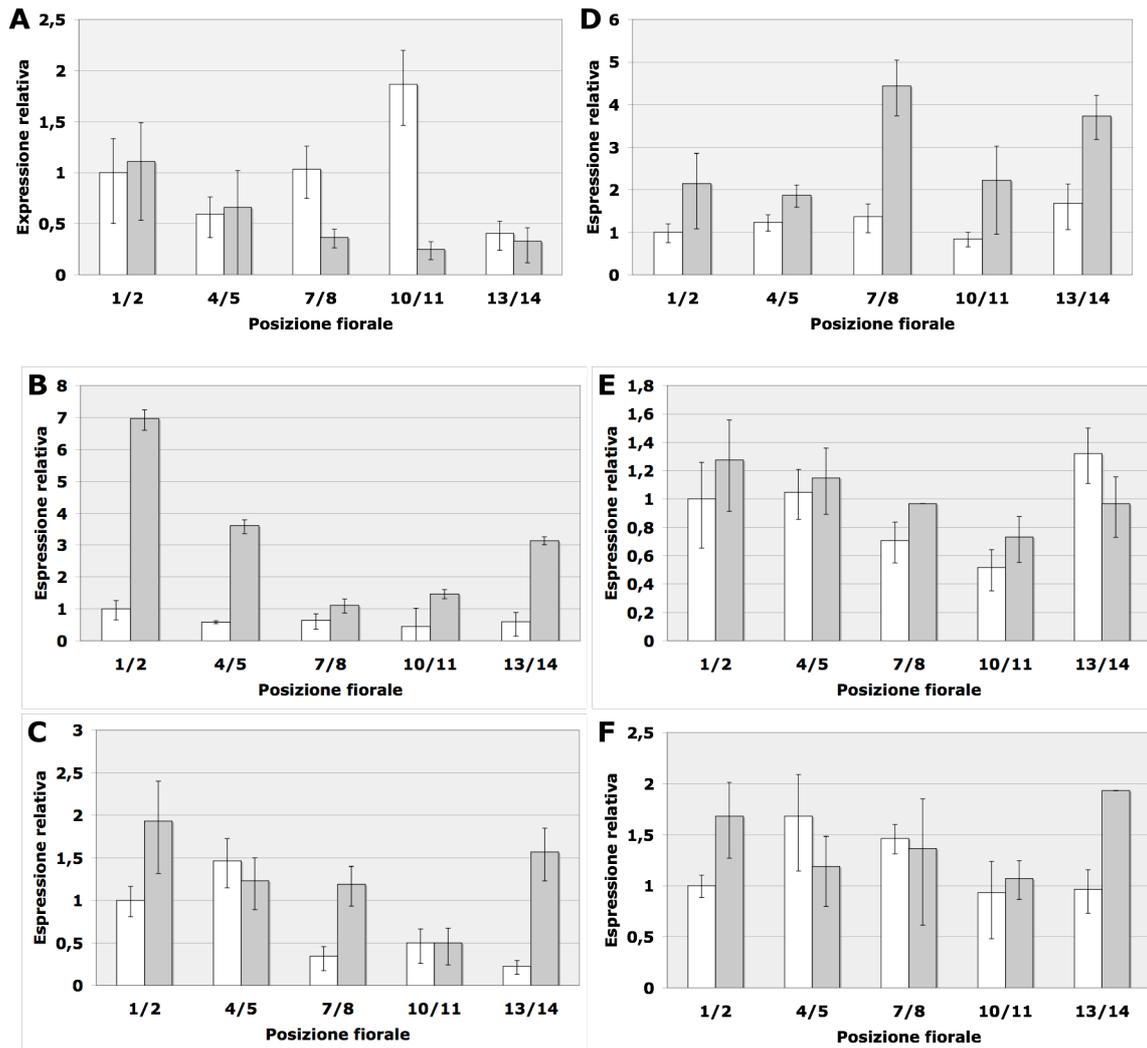


**Figura 3.18:** analisi di espressione del gene codificante per una glicosil idrolasi ( $\beta$ -1,3-glucanasi, *At1g11820*) (A, B e C) e *NYE1* (*Staygreen1* like, *At4g22920*) (D, E e F) tramite real-time RT-PCR valutata con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Sull'asse delle ordinate l'espressione relativa, sull'asse delle ascisse la posizione fiorale. A e D, espressione dei geni nel mutante *dab4-1* e controllo WS. B ed E, espressione dei gene nel mutante *dab5-1* e controllo WS. C e F, espressione dei geni nel mutante *ida* e controllo Col.

Il gene codificante per una  $\gamma$ -vpe (gamma vpe vacuolare, *At4g32940*) è responsabile della maturazione di proteine nei vacuoli, rompendo il legame peptidico dal lato carbossilico dei residui di asparagina. Questo enzima è sovraespresso durante la senescenza ed in seguito a trattamenti con etilene e acido jasmonico. Probabilmente non è direttamente coinvolto nell'abscissione, ma nella regolazione del metabolismo proteico associato alla senescenza. L'andamento

dell'espressione di questo gene nei tre mutanti è risultato pressoché lo stesso, anche se in *dab5-1* il valore relativo di espressione è apparso molto più alto (Figura 3.19 A, B e C). Questo potrebbe essere messo in relazione alla funzionalità del gene SCAMP (*dab5-1*) che codifica una proteina che interviene nella endocitosi.

L'enzima 4,6-glucosio deidrasi UDP dipendente, codificato dal gene *nsr/er*, (Nucleotide-Rhamnose Synthase/Epimerase-Reductase, At1g63000), regola la conversione dell'UDP-D-glucosio ad UDP-L-ramnosio richiesto per la biosintesi dei ramnogalatturonani I e II, componenti della parete cellulare (Oka et al., 2007). L'espressione di questo gene nei mutanti è risultata molto simile rispetto al *wild type*, tranne che per il mutante *dab4-1* proprio in corrispondenza dell'epoca di abscissione in posizione fiorale 7/8 (Figura 3.19 D, E ed F). Potrebbe esserci una sorta di aumento della resistenza della parete cellulare di questo mutante che ne provoca, assieme ad altri fattori, l'abscissione ritardata.

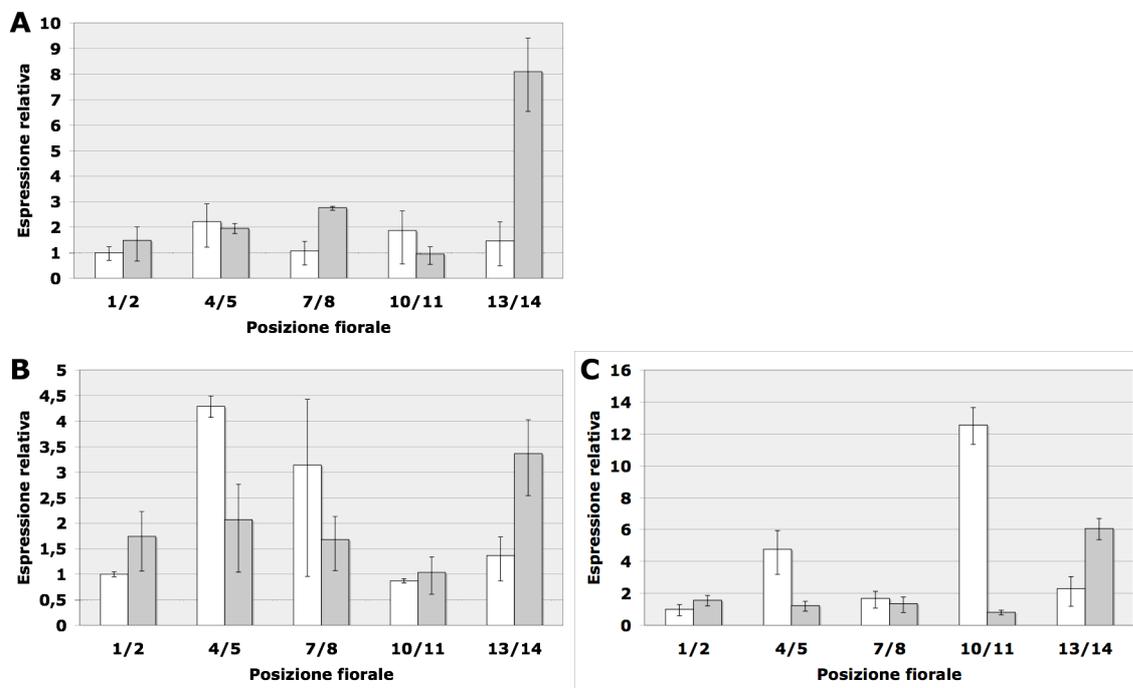


**Figura 3.19:** analisi di espressione di  $\gamma$ -vpe (At4g32940) (A, B e C) e nrs/er (At1g63000) (D, E e F) tramite real-time RT-PCR valutata con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Sull'asse delle ordinate l'espressione relativa, sull'asse delle ascisse la posizione fiorale. A e D, espressione dei geni nel mutante *dab4-1* e controllo WS. B ed E, espressione dei gene nel mutante *dab5-1* e controllo WS. C e F, espressione dei geni nel mutante *ida* e controllo Col.

Come per *Malus domestica* anche in *Arabidopsis* è stato selezionato il gene SnRK1 (Sucrose non-fermentig Related Kinase 1, At3g01090) che ha mostrato pattern di espressione simili nei due mutanti *dab4-1* e *ida*, seppur con un livello maggiore in *dab4-1* (Figura 3.20 A e B). Questo potrebbe essere indice di un ritardo della trascrizione del gene nei due mutanti che, in seguito ad un mantenimento dell'attività metabolica nella zona di abscissione per un tempo maggiore rispetto al

*wild type*, mostrano anche un ritardo della senescenza e invecchiamento di fiori e AZ.

Il gene BIG (At3g02260) è stato analizzato nel mutante *ida*. Il livello di espressione del gene è simile nel mutante e nel *wild type*, con un picco notevole di espressione esclusivamente alla posizione 10/11 in Columbia (Figura 3.20 C). Probabilmente dopo la caduta fisiologica dei petali in posizione 7/8, la traslocazione auxinica, disturbata per favorire l'abscissione, viene ripristinata con una maggior trascrizione del gene e un aumento del trasporto polare per ripristinare i livelli precedenti di ormone in direzione basipeta.



**Figura 3.20: analisi di espressione di SnRK1 (At3g01090) (A e B) e BIG (At3g02260) (C) tramite real-time RT-PCR valutata con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Sull'asse delle ordinate l'espressione relativa, sull'asse delle ascisse la posizione fiorale. A, espressione dei geni SnRK1 nel mutante *dab4-1* e controllo WS. B, espressione del gene SnRK1 nel mutante *ida* e controllo Col. C, espressione del gene BIG nel mutante *ida* e controllo Col.**

## 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 4.1 DISCUSSIONE

Al fine di ampliare la comprensione degli eventi molecolari associati alla cascola dei frutticini di melo (*Malus domestica*) è stata condotta un'analisi massiva del trascrittoma che ha portato all'identificazione di geni putativamente coinvolti nell'abscissione. Il cDNA-AFLP è stato scelto come tecnica d'elezione allo scopo di individuare in modo semplice e veloce un alto numero di geni direttamente o indirettamente coinvolti nell'attivazione della zona di abscissione.

Poichè dalla semplice ricerca in banca dati delle EST selezionate non sono stati ottenuti dettagli sufficienti ed esaustivi sulle sequenze, sono stati creati 166 contig e 93 singleton, blastando le EST su un database costruito *ad hoc* esclusivamente con sequenze espresse in melo, in seguito categorizzati secondo i criteri della gene ontology.

Questa classificazione ha consentito di individuare i processi metabolici maggiormente coinvolti nell'abscissione e di scegliere accuratamente i geni più adatti allo studio, sulla base anche di informazioni fisiologiche reperite in letteratura relative all'abscissione dei frutticini di melo.

In particolare, al fine di validare questo tipo di approccio massivo e di far luce su meccanismi molecolari specifici, sono stati scelti geni coinvolti nella regolazione delle attività di trasporto, del metabolismo proteico e dei carboidrati, dell'attività idrolasica e transferasica la cui espressione è stata valutata mediante RT-PCR

#### 4.1.1 L'induzione dell'abscissione influisce prevalentemente sul profilo trascrizionale della cortex.

Nonostante l'uso di tre differenti tessuti (seme, cortex e peduncolo), il numero dei cloni differenzialmente espressi più elevato è stato riscontrato nella cortex. Ciò è probabilmente dovuto alla complessità dei tessuti che la costituiscono (epidermide, tessuti vascolari e parenchimi di accumulo), ai differenti processi che si verificano (divisione e distensione cellulare, differenziamento del sistema vascolare,

formazione di amiloplasti) e alla dimensione. Il peduncolo è molto meno complesso da un punto di vista funzionale ed esso è quasi esclusivamente coinvolto nei fenomeni di trasporto che collegano il frutto e i semi con gli altri organi dell'albero. I semi, nelle fasi in cui è stato condotto l'esperimento, sono caratterizzati da un tumultuoso sviluppo dell'endosperma, mentre l'attività embriogenetica risulta alquanto ridotta. La maggiore complessità di funzioni ascritte alla cortex può quindi costituire una logica premessa giustificativa di una maggiore ricchezza del suo profilo trascrizionale e delle variazioni che intervengono nel corso della induzione dell'abscissione.

#### **4.1.2 Il controllo ormonale dell'abscissione**

E' generalmente accettato che l'attivazione dell'abscissione sia regolata dall'interazione tra auxine ed etilene a livello della zona di abscissione. Si conosce poco degli elementi coinvolti nel determinismo dell'abscissione e che concorrono a definire il segnale che, elaborato a livello dell'organo destinato a cadere, promuove l'attivazione dell'AZ e la separazione cellulare.

Nel melo è stato accertato che l'attivazione della zona di abscissione è preceduta da una stimolazione della biosintesi dell'etilene (Dal Cin et al., 2005a) suggerendo un coinvolgimento di tale ormone nella modulazione del processo. In questo lavoro alcuni cloni legati all'etilene come C005 (DY241901) che codifica per un ACO putativo, il C258 (DY242102) che codifica per una calmodulina stimolata dall'etilene e il clone S029 che codifica per una ACS putativa, sono risultati stimolati in AF confermando il ruolo svolto dall'etilene nell'abscissione del melo.

Per quanto attiene alle auxine, il clone C031 (DY241972) risulta particolarmente interessante essendo un ortologo di *BIG* in *Arabidopsis*. La proteina codificata da questo gene è necessaria per garantire il trasporto polare delle auxine e partecipa alla mobilizzazione vescicolare dei suoi trasportatori. E' stato ipotizzato che BIG sia essenziale per il corretto posizionamento del carrier di efflusso PIN1 nella membrana plasmatica (Luschnig, 2001). Il gene è sovraespresso nel seme, nel

peduncolo e nelle AZ dei NAF e sottoespresso nelle stesse regioni degli AF. Ciò è consonante con la necessità da parte dei frutti non abscendenti di mantenere un adeguato flusso auxinico per evitare l'attivazione della AZ. Più problematica risulta l'interpretazione dei maggiori livelli di espressione registrati nella cortex degli AF; è possibile che la funzione del gene possa differire in relazione alla tipologia di tessuto ed alla posizione nella cortex dove peraltro sono presenti elementi vascolari e parenchimi di accumulo, nei quali la distribuzione e la funzionalità dei carriers possono essere diversi.

Un altro clone regolato dalle auxine e differenzialmente espresso è C270, omologo della ciclina T1 in *Medicago truncatula* che forma un complesso con CDK1 ed agisce come regolatore positivo della trascrizione, svolgendo un ruolo analogo a quello del complesso CDK9/ciclina nell'uomo. E' dimostrato che il CDK;1-CYCT;1 contribuisce alla fosforilazione del dominio carbossi terminale della RNA polimerasi II per la regolazione della trascrizione. L'attività di questo complesso, a dispetto del nome, sembra essere indipendente dal ciclo cellulare, ed è stato suggerito che il complesso della chinasi CDK;1-CYCT;1 sia l'omologo nelle piante di P-TEFb presente nell'uomo (Fulop et al., 2005). I minori livelli di espressione di questo gene registrati in AZ, peduncoli e semi di AF, è compatibile con una minore attività trascrizionale. In cortex, sia di AF che di NAF, c'è una bassa espressione del gene con un calo nei frutti persistenti al quinto giorno.

Altri cloni che codificano per elementi coinvolti nel trasporto dell'auxina risultano regolati positivamente: il clone C209 (DY242154) che codifica per una proteina di simporto auxina-H<sup>+</sup> e il clone P135 (DY242007) che codifica per PIN7. Il fatto che questi cloni siano regolati positivamente in AF, mentre i cloni C046 e C132 che codificano, rispettivamente, una proteina di legame per ARF1 ed una proteina del tipo ARF7b siano regolati negativamente, indica che la cortex di AF è caratterizzata da livelli più elevati di auxina.

E' stato peraltro dimostrato che geni coinvolti nel trasporto auxinico sono positivamente regolati dall'ormone a livello trascrizionale (Vieten et al., 2005) e che ARF1 e ARF2 influenzano negativamente la risposta all'auxina (Ellis et al., 2005).

D'altra parte il fatto che il clone C303 (DY242162) che codifica una proteina *auxin responsive* ed il clone P171 (DY242036) che codifica un IAA-aa idrolasi siano entrambi regolati negativamente in AF suggerisce che il quadro regolativo su cui si inserisce l'azione delle auxine sia molto più complesso di quanto generalmente ipotizzato.

Per quanto attiene agli altri ormoni sono stati individuati solo due cloni relativi uno all'ABA e l'altro alle gibberelline: ciò confermerebbe che nel determinismo della abscissione etilene ed auxina sono gli ormoni più importanti.

#### **4.1.3 Livello di carboidrati**

Una delle ipotesi della regolazione della cascola fisiologica dei frutticini è che, oltre al controllo ormonale, intervenga nel processo anche un deficit di carboidrati con un'azione deterministica nell'induzione dell'abscissione. Una volta che l'abscissione è stata indotta, i carboidrati presenti nel frutto vengono mobilizzati e riallocati in altre parti della pianta.

I risultati riportati in questo lavoro dimostrano come, nel corso dell'attivazione dell'abscissione, si modifichi il profilo trascrizionale di un numero rilevante di geni coinvolti nella respirazione mitocondriale e nel metabolismo degli zuccheri, confermando la validità dell'ipotesi nutrizionale nel determinismo della cascola fisiologica. Infatti alcuni dei cloni sono chiaramente connessi alla mobilizzazione degli zuccheri come, ad esempio, il C013 che codifica per una beta-amilasi e S020 che codifica per un trasportatore putativo degli zuccheri ERD6-like. Quest'ultimo è coinvolto nella riallocazione dei carboidrati associata alla senescenza di organi. È simile ad un gene codificante un putativo trasportatore di zuccheri localizzato nei vacuoli della radice di bietola (Chiou and Bush, 1996) e ad un gene di *Arabidopsis* indotto dalla disidratazione e dall'esposizione al freddo (Kiyosue et al., 1998). I livelli di zuccheri, come galattosio, fruttosio e glucosio, aumentano nelle foglie senescenti di *Arabidopsis thaliana* e molti geni codificanti trasportatori di monosaccaridi aumentano parallelamente negli stessi tessuti (Quirino

et al., 2001). Una sovraespressione di geni che codificano trasportatori di zuccheri è stata osservata in risposta a stress ambientali (Kiyosue et al., 1998) o in presenza di ferite o attacchi da patogeni (Buttner and Sauer, 2000). Il gene ERD6-like è simile a *SFP1* e *SFP2* (*sugar-porter family protein 1 e 2*), anche se solo *SFP1* è coinvolto nella senescenza (Quirino et al., 2001), ed è più espresso nei tessuti dei frutticini abscidenti. Tenendo conto che l'espressione del gene aumenta nella cortex dei frutti abscidenti, esso potrebbe essere coinvolto nella mobilizzazione dei carboidrati che precede il distacco dell'organo.

Altri cloni come il C135 che codifica un enzima coinvolto nella biosintesi del ramnosio ed il clone C160 che codifica una endo- $\beta$ -1,3-glucanasi, sono regolati negativamente, indicando probabilmente disturbi nella deposizione del materiale parietale nel corso dell'abscissione. Una modificazione della struttura parietale può essere dovuta anche ad un aumento delle idrolasi, infatti si è osservato un aumento dei trascritti dei cloni S028 e C035 che codificano rispettivamente una cellulasi ed un precursore della beta-galattosidasi. Si ipotizza che il clone S028, simile ad una cellulasi coinvolta nell'abscissione, possa promuovere il distacco del seme dai tessuti materni agendo a livello della calaza, determinando l'aborto dell'embrione. La beta-galattosidasi, invece, è generalmente indotta da ferita e da stress biotici ed è presente in una vasta tipologia di organi compresa la cortex di mele (Ross et al., 1994) e pere giapponesi (Kitagawa, 1995) in corrispondenza della maturazione. In alberi di arancio cv Valentia è stato accertato che tale enzima è stimolato in zone di abscissione di foglie e frutti maturi in seguito al trattamento con ethephon e con CMN-pirazolo (Wu and Burns, 2004). Gli stessi enzimi possono anche essere coinvolti nella produzione di energia conseguentemente a processi degradativi della parete cellulare e durante il rilascio di galattosio libero nel riciclo metabolico di galactolipidi, glicoproteine e altri componenti parietali (Tateishi et al., 2001). Nei frutti le  $\beta$ -galattosidasi sono presenti in diverse isoforme e sono gli unici enzimi in grado di rompere il legame  $\beta$ -glicosidico terminale della cellulosa nel corso del processo di degradazione della parete cellulare anche se non tutti gli isoenzimi possono essere coinvolti nel rammollimento del frutto (Tateishi et al., 2001). Il gene

omologo in *Arabidopsis thaliana* (At5g56870) è altamente sovraespresso a seguito di trattamenti con BA e durante la senescenza (Zimmermann et al., 2004). E' possibile che l'aumento dell'espressione del gene nei semi e nei peduncoli osservato alcuni giorni dopo i trattamenti sia un sintomo di senescenza indotta da BA. Questa  $\beta$ -galattosidasi è, inoltre, sottoespressa in presenza contemporaneamente di glucosio e saccarosio e questo potrebbe spiegare i bassi livelli osservati nella cortex dei frutticini non-abscidenti. Al fine di poter accuratamente valutare un possibile coinvolgimento di questo gene nei processi di degradazione della parete cellulare nelle zone di abscissione sarebbe necessario analizzare questa regione prima della *lag phase*.

Il gene *CalS1* codificante per la callosio sintasi è un altro gene coinvolto nel metabolismo del carbonio. Le piante possono avere due tipi di callosio sintasi: una forma  $\text{Ca}^{2+}$ -independente, che si può individuare nei tubi pollinici, e una forma attivata dal  $\text{Ca}^{2+}$ , identificata in numerosi altri tessuti. In *Arabidopsis*, è stata descritta una proteina localizzata nel fragmoplasto (CalS) che interagisce con la fragmoplastina e con una sequenza simile a quella della  $\beta$ -1,3-glucano sintasi di lievito. CalS insieme ad altre proteine è coinvolta nella sintesi del callosio durante la formazione del fragmoplasto, che precede la sintesi della cellulosa. Solitamente, la deposizione del callosio è indotta da ferite, infezione da patogeni e stress (Hong et al., 2001; Verma and Hong, 2001) e dopo l'abscissione delle foglie. E' stata osservata una sottoespressione di questo gene in tutti i tessuti dei frutticini abscidenti, con l'eccezione del tessuto corticale, dove non si è riscontrata alcuna differenza tra AF e NAF. L'alta presenza di questo prodotto genico nelle zone di abscissione dei NAF potrebbe essere giustificata dalla necessità dei frutticini non abscidenti di rinforzare questo tessuto per impedire l'abscissione.

Altri cloni isolati codificano proteine coinvolte nel metabolismo degli zuccheri: P113 (DY241991) che codifica una galattosio/glucosio pirofosforilasi UDP-dipendente, C039 (DY241973) codificante una UDP-glucosio epimerasi, C051 (DY241933) codificante una glicosiltransferasi.

La galattosio/glucosio pirofosforilasi controlla il rapporto glucosio-1P/UDP-glucosio e con altri enzimi regola l'architettura dei polisaccaridi e dei loro derivati (Kotake et al., 2004). Questo gene è sottoespresso nella zona di abscissione, nel seme e nel peduncolo di frutticini abscidenti, mentre risulta più espresso nella cortex. Quest'ultimo risultato suggerisce che ci sia un differente equilibrio omeostatico in questo tessuto responsabile di modifiche metaboliche che sono compatibili con la stimolazione dei fenomeni di mobilitazione dei carboidrati in frutti abscidenti.

Altri cloni sono correlati alla respirazione: tra questi sono positivamente espressi C016 (DY241951) codificante un trasportatore dell'oxoglutarato/malato, C228 (DY242112) che codifica una citrato sintasi, C267 (DY242093) che codifica una malato ossidoreduttasi, C302 (DY242157) codificante una mannosio-6-fostato reductasi NADPH-dipendente, S013 (DY241935) codificante una piruvato decarbossilasi, S015 (DY241957) codificante una alcool deidrogenasi è negativamente regolato

#### **4.1.4 Interazione tra stato ormonale e metabolismo degli zuccheri**

I risultati di questo studio sembrano suggerire che durante l'induzione dell'abscissione il metabolismo degli zuccheri sia molto attivo. Uno dei geni trovati come differenzialmente espresso è simile a SnRK1, proteina che regola il rapporto saccarosio/glucosio (Halford and Hardie, 1998). Questa serin/treonina chinasi appartiene alla famiglia delle protein chinasi SNF1, che comprende SNF1 (sucrose non-fermenting 1) in lievito, AMPK (AMP activated protein kinase) nei mammiferi e SnRK nelle piante. In lievito e nei mammiferi, SNF1 e AMPK proteggono le cellule da stress nutritivi o ambientali (Halford and Hardie, 1998). SNF1, inoltre, è richiesta per la derepressione di tutti i geni repressi dal glucosio; è necessaria per l'espressione della saccarosio sintasi in patata e funge da regolatore attivo dello stato fosforilativo di parecchi enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati (Halford et al., 2003). SnRK1 è coinvolta nella trasduzione dei segnali ormonali interagendo con la subunità SKP1/ASK1 della ubiquitin-ligasi E3 che fa parte del complesso di

poliubiquitinazione SCF. Allo stesso tempo, la proteina è coinvolta nella regolazione pleiotropica del metabolismo e della segnalazione ormonale mediante interazione con PRL1 (pleiotropic regulatory locus 1) che compete per il legame di SnRK con SKP1/ASK1 (Farras et al., 2001). Questa proteina è coinvolta nella fosforilazione dei substrati del complesso SCF<sup>TR1</sup>, responsabile della degradazione di AUX/IAA (Farras et al., 2001) e dei substrati SCF<sup>EBF1/EBF2</sup>, coinvolti nella degradazione di EIN3 (Guo and Ecker, 2003; Quint et al., 2005). Questa stessa chinasi partecipa, inoltre, al metabolismo dei lipidi, alla regolazione del trasporto cellulare e alla biogenesi di perossisomi e mitocondri, funzioni queste fondamentali per la vitalità cellulare. Nei semi dei frutticini non abscendenti *SnRK1* è sovraespresso. Si potrebbe speculare che questi organi, i più importanti per la pianta, debbano essere protetti dagli stress e dalla privazione di nutrienti e necessitino di una regolazione fine delle vie trasduttive del segnale auxinico ed etilenico. Questo non è il caso dei frutticini abscendenti, nei quali il livello di espressione è risultato inferiore, a dimostrazione di uno stato metabolico già alterato.

Il gene P112, che codifica una glicosil idrolasi della famiglia 17 potrebbe assolvere ad una funzione analoga a quella delle taumatine. La proteina è coinvolta nel metabolismo dei carboidrati e l'attività endo- $\beta$  1,3-glucanasica potrebbe giocare un ruolo nella difesa dai patogeni o nella degradazione della parete cellulare (Menu-Bouaouiche et al., 2003). Questa idrolasi potrebbe non essere direttamente coinvolta nell'abscissione, ma correlata con la senescenza associata all'induzione dell'abscissione. Probabilmente, questo è uno dei geni che cambiano il metabolismo degli zuccheri e, in generale, del carbonio in risposta agli stress ambientali. Il gene omologo in *Arabidopsis* (At1g11820) è solitamente sottoespresso nel corso della senescenza e sovraespresso in presenza di saccarosio (Zimmermann et al., 2004); ciò è compatibile con l'azione di regolazione che SnRK1 esercita sul bilancio saccarosio/glucosio (Halford and Hardie, 1998).

#### 4.1.5 Correlazioni tra abscissione e senescenza nei frutticini

Come puntualizzato precedentemente, abscissione dei frutticini e senescenza non possono essere considerati come parte dello stesso fenomeno, anche se possono condividere parte dei meccanismi regolativi.

Durante la senescenza il turnover delle proteine è cruciale: in questo processo, un ruolo importante è svolto dalle proteasi, responsabili della maturazione e della degradazione proteica. Questi enzimi promuovono attivamente la senescenza (Pak, 2005) e la morte cellulare programmata (Rotari, 2005) ed è noto che alcuni trascritti codificanti per queste proteine sono regolati positivamente dall'etilene (Alonso and Granell, 1995). A ciò può essere ascritta la regolazione positiva dei cloni C133 (DY241993) and P169 (DY242026) codificanti una asparaginil sintetasi, coinvolta nella senescenza (Eason et al., 2007). Inoltre, la sovraespressione di S029 (codificante una cistein proteasi) potrebbe essere sintomatica di un aumento della disidratazione, analogamente a quanto osservato in broccolo (Coupe et al., 2003), indice di uno squilibrio idrico.

Per quanto riguarda l'aspartil proteinasi P306, il gene è stato selezionato per il ruolo fondamentale che le proteasi giocano nella maturazione e nella degradazione delle proteine. In *Arabidopsis* il trascritto codificante per aspartil proteinasi è stato trovato in semi, fiori, fusto e radici. In riso il gene è espresso intensamente nelle prime tappe della embriogenesi e diminuisce nelle fasi successive dello sviluppo del seme (Mutlu, 1999). E' stato dimostrato inoltre che una aspartil proteasi codificata da *PCS1* in *Arabidopsis* previene la morte cellulare durante l'embriogenesi; la sua espressione ectopica inoltre rallenta la deiscenza delle antere indotta da ethephon (Ge et al., 2005). Il gene è risultato sovraespresso nei peduncoli e nei semi di NAF, mentre è negativamente regolato nei semi, peduncoli e zone di abscissione di AF. E' possibile che la sottoespressione osservata negli AF sia da mettere in relazione con una stimolazione della senescenza, associata all'induzione dell'abscissione.

Altro indicatore dello stato di senescenza è il gene P204, omologo di *Staygreen* che è responsabile della degradazione della clorofilla e dell'enzima

rubisco. Piante di soia *wild type* mantengono un alto potenziale idrico fino all'abscissione, mentre il mutante recessivo *d1d1d2d2* perde acqua più tardivamente durante il processo di senescenza, suggerendo una ritenzione idrica alterata. Lo stesso mutante ha una degradazione di clorofilla e rubisco inibita: la mutazione è nella via di controllo dello smantellamento del cloroplasto e della gestione del bilancio idrico. In altre specie il mutante mantiene i componenti del cloroplasto senza alterazioni del bilancio idrico (Luquez and Guiamet, 2002). Il gene in questione è estremamente sottoespresso in semi di AF probabilmente a causa dello stress idrico e della senescenza, associati all'induzione dell'abscissione. Non sono state osservate grandi differenze nella espressione del gene in cortex e zone di abscissione delle due popolazioni di frutti. Nei peduncoli di AF e NAF l'espressione, simile al secondo giorno, diminuisce in modo significativo al primo e quinto giorno.

#### **4.1.6 Analisi di espressione in mutanti con abscissione disturbata in *Arabidopsis thaliana***

Per verificare se i geni individuati con l'approccio cDNA-AFLP in melo sono coinvolti nel determinismo dell'abscissione in generale, sono stati individuati alcuni geni omologhi presenti in *Arabidopsis* di cui è stata valutata la espressione mediante real time RT-PCR in zone di abscissione di mutanti con abscissione della corolla disturbata.

Il gene *AtNYE1* (*Staygreen1* like) presenta in *dab4-1*, *dab5-1* e *ida* livelli di espressione siano simili a quelli dei rispettivi wild type, indicando che, nonostante l'abscissione sia ritardata o assente, il processo di senescenza è normale o solo lievemente ritardato. Ulteriori studi su *Staygreen1* e 2 potrebbero migliorare la comprensione della relazione tra senescenza e abscissione.

Il gene *At1g11820*, omologo alla  $\beta$ -1,3-glucanasi di melo è apparso maggiormente espresso nelle posizioni 7/8 di *dab4-1* e *dab5-1* e nelle posizioni 10/11 del mutante *ida*. Il gene codifica per uno degli enzimi parte del sistema messo

in atto dalla pianta per degradare la parete cellulare. Nonostante il livello di espressione di questo gene sia pari o superiore a quello del *wild type* i mutanti non abscindono; ciò può essere imputato ad un disturbo post-trascrizionale tenuto conto che nei mutanti il livello dei trascritti è normale.

Altro gene interessante preso in considerazione è *Serk1*, codificante una chinasi RLK-LRR generalmente coinvolta nell'embriogenesi che è risultata decisamente sottoespressa in tutti i mutanti. Il gene fa parte di una famiglia multigenica composta da cinque elementi. Per *Serk2*, *Serk3* e *Serk4* non è stato possibile disegnare primer specifici in grado di distinguere i tre tipi di trascritto, mentre sono state condotte prove di espressione anche per *Serk5* che non è presente nelle zone di abscissione (dati non mostrati). Il coinvolgimento di *Serk* nell'abscissione può essere messo in relazione ad altre chinasi dello stesso tipo come *HAESA*. E' possibile un coinvolgimento delle chinasi RLK ad abscissione avvenuta data l'espressione molto alta nel *wild type* in particolare nelle posizioni fiorali 10/11 e 14/15.

Un gene considerato nello studio in *Arabidopsis* è *NRS/ER* (at1g63000) che codifica per un enzima responsabile del metabolismo degli zuccheri e del ramnosio, componente fondamentale dei polisaccaridi di parete RC-I e RC-II (ramnogalacturonani I e II). Il livello di espressione di questo gene è superiore nel mutante *dab5-1*, mentre in *dab4-1* e *ida* il livello di espressione è analogo a quello che si osserva nel *wild type*. Pur non essendo il fattore determinante per il ritardo dell'abscissione è possibile che un aumentato del metabolismo del ramnosio porti a irrobustire la parete cellulare nelle AZ di *dab5-1*, rendendo più difficoltoso il distacco dei petali.

Un altro gene differenzialmente espresso è  $\gamma$ -*vpe* (At4g32940) che codifica per un enzima vacuolare responsabile della maturazione di proteine nei vacuoli, rompendo il legame peptidico dal lato carbossilico dei residui di asparagina. Questo enzima è sovraespresso durante la senescenza ed in seguito a trattamenti con etilene e acido jasmonico. Probabilmente non è direttamente coinvolto nell'abscissione, ma nella regolazione del metabolismo proteico associato alla senescenza.

L'andamento dell'espressione di questo gene nei tre mutanti è risultato pressoché lo stesso, anche se in *dab5-1* il valore relativo di espressione è apparso molto più basso. Questo potrebbe essere messo in relazione alla funzionalità del gene *SCAMP (dab5-1)* che codifica per una proteina che interviene nella endocitosi. Il knockout *dab5-1* ha probabilmente disturbi nel trasporto vescicolare e quindi nel trasporto delle proteine ai vacuoli. Negli altri due mutanti l'alta espressione del gene indica una attività proteica più intensa e prolungata a livello della zona di abscissione che, di fatto, non porta a termine la sua funzione restando comunque pronta ad assolverla.

I restanti due geni considerati sono *SnRK1* su *dab4-1* e *ida*, e *BIG* su *ida*. *SnRK1* ha mostrato pattern simili nei due mutanti seppure con un livello di espressione maggiore in *dab4-1*. L'aumento di espressione nelle posizioni fiorali avanzate potrebbe essere spiegato con un ritardo generalizzato della trascrizione del gene in seguito ad un mantenimento dell'attività metabolica delle cellule per un tempo maggiore rispetto a quelle del *wild type*. *BIG*, invece, ha una espressione nel mutante simile a quella del *wild type*, a parte un picco di espressione in Columbia dopo l'abscissione. Può essere che, espletata la funzione fisiologica della caduta dei petali, la normale traslocazione auxinica con il trasporto polare venga ripristinata.

## **4.2 CONCLUSIONI**

L'abscissione di un organo vegetale rientra nell'ontogenesi della pianta e costituisce un processo di sviluppo altamente regolato da una serie di fattori endogeni ed esogeni, tra i quali etilene e auxine che funzionano come principali modulatori della sindrome. Restano ancora sconosciuti l'identità dei segnali e le loro vie trasduttive che portano all'attivazione dell'abscissione. Precedenti studi sull'abscissione in piante modello hanno avuto come scopo la caratterizzazione di mutanti o di fenotipi coinvolti nell'abscissione, ma insufficienti a fornire un'idea generale del fenomeno. Considerando che molto probabilmente il segnale di

attivazione delle AZ ha origine nel seme e/o nel frutto, che il genoma di melo non è noto e non sono ancora disponibili microarray specifici di melo è risultato essenziale estendere la nostra analisi a seme, cortex e peduncolo con un approccio massivo. La tecnica cDNA-AFLP è stata scelta come analisi per il display differenziale tra popolazioni di frutti abscidenti (AF) e non abscidenti (NAF). Dalle 278 EST ottenute con il cDNA-AFLP sono state creati contig e singleton blastando le sequenze su un database costruito *ad hoc* a partire da sequenze espresse di melo. La suddetta analisi bioinformatica e la classificazione ontologica nei tre vocabolari principali della gene ontology (processo biologico, componente cellulare e funzione molecolare), sono state utili all'identificazione di geni direttamente o indirettamente coinvolti nell'abscissione e nell'individuazione delle attività metaboliche maggiormente implicate nella sindrome.

E' risultato evidente che la pianta, prima di indurre il distacco dell'organo, attiva una serie di meccanismi fisiologici e biochimici atti a mobilitare i costituenti cellulari, allo scopo di riciclare i nutrienti in altri tessuti. Tali eventi, che caratterizzano qualsiasi fenomeno di senescenza, costituiscono lo stadio finale di sviluppo di un organo o di un tessuto e sono evocati in corrispondenza di organi non più funzionali, destinati ad essere eliminati. Nel caso dei frutticini della popolazione AF, ciò si è verificato principalmente nella cortex e nel seme, parti del frutto con il maggior numero di sequenze regolate positivamente deputate al metabolismo proteico. Parte di questo metabolismo è deputato a processi degradativi che hanno interessato in primo luogo le proteine, con una significativa stimolazione di endoproteasi e di sistemi di poli-ubiquitinazione. In quest'ultimo caso, oltre alla degradazione proteica, è stato ipotizzato un ruolo nella regolazione di pathway di trasduzione di segnali ormonali come l'auxina o l'etilene. Per quanto riguarda i fenomeni di idrolisi proteica è stato, inoltre, messo in evidenza un sostanziale coinvolgimento di membri delle due più importanti famiglie di proteine coinvolte nel traffico vescicolare (Rab e SNARE). La stimolazione del traffico vescicolare risulta infatti fondamentale per la compartimentalizzazione delle reazioni biochimiche e per il trasporto di proteine.

Sono stati identificati cloni omologhi a geni codificanti per enzimi con attività ossidoriduttasica, come la glutatione riduttasi nella cortex e la lipossigenasi nel seme. Si tratta di proteine con svariate funzioni che si esplicano principalmente in condizioni di stress, ma che possono essere coinvolte anche in vari processi, come lo sviluppo, la trasduzione di segnali ormonali, la maturazione o la senescenza. Vari altri cloni hanno manifestato similarità con geni coinvolti in condizioni di stress indotte da ferita o patogeni. Nel caso della cascola fisiologica, l'abscissione fa parte di un preciso programma di sviluppo. E' possibile dunque che, seppur le cause scatenanti la sindrome siano diverse, vengano evocate pathway di risposta e di trasduzione dei segnali in qualche modo comuni. Questa ipotesi viene avvalorata dal fatto che il principale aspetto che accomuna abscissione e senescenza è l'aumento nella biosintesi e nella percezione dell'etilene.

Un altro aspetto interessante è il fatto che le variazioni di espressione genica sono peculiari per ogni tessuto. In particolare nel peduncolo non si registra un significativo coinvolgimento del catabolismo proteico nei frutticini destinati ad abscindere, rispetto alla cortex ed al seme. In peduncolo viene invece maggiormente stimolata l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo, e in particolare una serie di fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia delle *zinc finger protein*, noti per essere i principali fattori di una corretta ontogenesi degli organi vegetali. A livello del peduncolo, il manifestarsi dei sintomi della senescenza avviene in ritardo rispetto a cortex e semi, probabilmente per un tentativo della pianta di preservare più a lungo questo tessuto per sfruttare fino in fondo le sue funzionalità. Una possibile spiegazione risiede nel fatto che il peduncolo rappresenta l'organo attraverso cui avviene la riallocazione dei nutrienti mobilizzati dalla cortex e dal seme e trasferiti ai frutticini centrali e al germoglio laterale. In secondo luogo, vista la precedente ipotesi secondo cui il segnale di abscissione ha origine nel seme e/o nel frutto, risulta necessario preservare il peduncolo per assicurare la traslocazione del segnale fino alla AZ, dove si compierà la risposta morfogenetica.

L'analisi cDNA-AFLP ha dunque permesso di identificare geni coinvolti direttamente o indirettamente nell'abscissione e di evidenziare attività enzimatiche e

processi metabolici differenzialmente stimolati in due popolazioni di frutticini con potenziale di abscissione divergente. Le informazioni raccolte hanno permesso di selezionare i geni successivamente studiati in *Arabidopsis*.

Lo studio di mutanti *knockout* di *Arabidopsis* per i geni omologhi a quelli trovati in melo non ha portato a fenotipi evidenti in termini di abscissione disturbata a livello macroscopico e microscopico anche in presenza di etilene (noto induttore dell'abscissione). Questo ha confermato che nessuno dei geni studiati è l'attore principale del processo di abscissione. Tuttavia analisi a livello molecolare degli stessi geni su AZ di mutanti con abscissione disturbata hanno confermato un qualche coinvolgimento dei suddetti geni. E' auspicabile un nuovo studio con doppi, tripli mutanti per evitare la ridondanza dei geni appartenenti a famiglie multigeniche. Inoltre è possibile studiare in *Arabidopsis* gli omologhi di ulteriori geni identificati con il cDNA-AFLP per verificare eventuali fenotipi abscindenti e studiare l'analisi di espressione in questi e nuovi mutanti con abscissione disturbata.

#### **4.2.1 Prospettive future**

Un ulteriore sviluppo della presente ricerca comprenderà l'allestimento di un microarray dedicato comprendente circa 4000 geni appartenenti alle principali categorie putativamente coinvolte nell'abscissione, come risultato dalle analisi cDNA-AFLP. I geni che verranno depositati sul vetrino saranno scelti sulla base delle categorie identificate in precedenza, comprendendo quelli già isolati ed altri che appartengono alle stesse categorie funzionali. Inoltre, verranno incluse anche le EST con implicazioni importanti nella biosintesi e trasduzione del segnale di etilene ed auxina.

La disponibilità di tale strumento consentirà l'identificazione dei geni direttamente coinvolti nella regolazione dell'abscissione. Il chip verrà impiegato per analizzare il trascrittoma di genotipi auto-diradanti. Inoltre, saranno studiate alcune cultivar di melo il cui potenziale di abscissione dei frutticini è stato alterato tramite trattamenti manuali o chimici. La problematica del diradamento richiede, infatti,

soluzioni a breve termine a causa degli alti costi di gestione dell'intervento e della necessità urgente di individuare nuovi composti chimici che sostituiscano le molecole attualmente impiegate che saranno presto proibite dalla legislazione nazionale. I risultati degli esperimenti di microarray saranno validati in RT-PCR ed utilizzati per costituire un set di marcatori da impiegare nei programmi di selezione assistita di nuovi genotipi di melo con caratteristiche autodiradanti. Oltre alle analisi del trascrittoma di seme, cortex, peduncolo e AZ, verranno studiati i pattern di espressione genica in tipi cellulari specifici isolati tramite la microdissezione al laser (LM). Si potrà procedere quindi all'isolamento di cellule specifiche dalle quali estrarre l'RNA totale che verrà in seguito amplificato ed ibridato al microarray. Parallelamente agli studi trascrittomici, verranno condotti studi di proteomica negli stessi tipi cellulari, consentendo l'identificazione diretta di prodotti genici coinvolti nell'abscissione.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Addicott, F. T. (1970). Plant Hormones in Control of Abscission. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **45**, 485-&.
- Albertini, E., Marconi, G., Reale, L., Barcaccia, G., Porceddu, A., Ferranti, F., and Falcinelli, M. (2005). SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiol* **138**, 2185-99.
- Alonso, J. M., and Granell, A. (1995). A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in Citrus fruit. *Plant Physiol* **109**, 541-7.
- Bachem, C. W., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., and Visser, R. G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* **9**, 745-53.
- Bachem, C. W. B., Oomen, R. J. F. J., and Visser, R. G. F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**, 157-173.
- Bangerth, F. (2000). Abscission and thinning of young fruit and thier regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regulation* **31**, 43-59.
- Barcaccia, G. V., S.; Meneghetti, S.; Albertini, E.; Porceddu, A.; Parrini, P.; Lucchin, M. (2001). Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* spp.: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. *Sexual Plant Reproduction* **14**, 233-238.
- Belfield, E. J., Ruperti, B., Roberts, J. A., and McQueen-Mason, S. (2005). Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J Exp Bot* **56**, 817-23.
- Bertioli, D. J., Schlichter, U. H., Adams, M. J., Burrows, P. R., Steinbiss, H. H., and Antoniw, J. F. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**, 4520-3.
- Beyer, E. M. (1975). Abscission: The Initial Effect of Ethylene Is in the Leaf Blade. *Plant Physiol* **55**, 322-327.

- Bleecker, A. B., and Patterson, S. E. (1997). Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**, 1169-79.
- Blencowe, B. J., and Ouzounis, C. A. (1999). The PWI motif: a new protein domain in splicing factors. *Trends Biochem Sci* **24**, 179-80.
- Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., and Casadoro, G. (1992). Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol Biol* **20**, 839-48.
- Bonghi, C., Tonutti, P., and Ramina, A. (2000). Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regulation* **31**, 35-42.
- Brown, K. M. (1997). Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum* **100**, 567-576.
- Burget, E. G., Verma, R., Molhoj, M., and Reiter, W. D. (2003). The biosynthesis of L-arabinose in plants: molecular cloning and characterization of a Golgi-localized UDP-D-xylose 4-epimerase encoded by the MUR4 gene of Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 523-31.
- Burk, D. H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W. H., and Ye, Z. H. (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**, 807-27.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G. E., Amundsen, S. S., Mandal, A., and Aalen, R. B. (2003). Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in Arabidopsis and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell* **15**, 2296-307.
- Buttner, M., and Sauer, N. (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 263-74.
- Chatre, L., Brandizzi, F., Hocquellet, A., Hawes, C., and Moreau, P. (2005). Sec22 and Memb11 are v-SNAREs of the anterograde endoplasmic reticulum-Golgi pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Plant Physiol* **139**, 1244-54.
- Chen, Q. H. G., and Bleecker, A. B. (1995). Analysis of Ethylene Signal-Transduction Kinetics Associated with Seedling-Growth Response and Chitinase Induction in Wild-Type and Mutant Arabidopsis. *Plant Physiology* **108**, 597-607.
- Chiou, T. J., and Bush, D. R. (1996). Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol* **110**, 511-20.

- Clements, J., and Atkins, C. (2001). Characterization of a non-abscission mutant in *Lupinus angustifolius*. I. Genetic and structural aspects. *Am J Bot* **88**, 31-42.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C. E., and Schroeder, J. I. (2005). Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* **17**, 3350-61.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-6.
- Coupe, S. A., Sinclair, B. K., Watson, L. M., Heyes, J. A., and Eason, J. R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J Exp Bot* **54**, 1045-56.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 5-17.
- Da Costa, M., Bach, L., Landrieu, I., Bellec, Y., Catrice, O., Brown, S., De Veylder, L., Lippens, G., Inze, D., and Faure, J. D. (2006). Arabidopsis PASTICCINO2 is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. *Plant Cell* **18**, 1426-37.
- Dal Cin, V., Danesin, M., Boschetti, A., Dorigoni, A., and Ramina, A. (2005a). Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). *J Exp Bot* **56**, 2995-3005.
- Dal Cin, V., Danesin, M., Rizzini, F. M., and Ramina, A. (2005b). RNA extraction from plant tissues - The use of calcium to precipitate contaminating pectic sugars. *Molecular Biotechnology* **31**, 113-119.
- Darley, C. P., Forrester, A. M., and McQueen-Mason, S. J. (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol* **47**, 179-95.
- Donson, J., Fang, Y., Espiritu-Santo, G., Xing, W., Salazar, A., Miyamoto, S., Armendarez, V., and Volkmuth, W. (2002). Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* **48**, 75-97.
- Dorigoni, A. (2003). Nuovi diradanti del melo da affiancare a quelli già in uso. In "La frutticoltura nelle valli del Noce" (I. A. d. S. M. all'Adige, Ed.), Trento.

- Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**, 963-77.
- Earley, K. W., Shook, M. S., Brower-Toland, B., Hicks, L., and Pikaard, C. S. (2007). In vitro specificities of Arabidopsis co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J* **52**, 615-26.
- Eason, J. R., Patel, D., Ryan, D., Page, B., Hedderley, D., Watson, L., and West, P. (2007). Controlled atmosphere treatment of broccoli after harvest delays senescence and induces the expression of novel BoCAR genes. *Plant Physiol Biochem* **45**, 445-56.
- Eastmond, P. J., van Dijken, A. J., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D., Smeekens, S. C., and Graham, I. A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant J* **29**, 225-35.
- Ekkehard, K. (2001). From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* **87**, 139-155.
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., and Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development* **132**, 4563-74.
- Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., and Koncz, C. (2001). SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *Embo J* **20**, 2742-56.
- Fernandez, D. E., Heck, G. R., Perry, S. E., Patterson, S. E., Bleecker, A. B., and Fang, S. C. (2000). The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* **12**, 183-98.
- Fulop, K., Pettko-Szandtner, A., Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, E., Dudits, D., and Bako, L. (2005). The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J* **42**, 810-20.

- Ge, X., Dietrich, C., Matsuno, M., Li, G., Berg, H., and Xia, Y. (2005). An Arabidopsis aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep* **6**, 282-8.
- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K. C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M., and Chory, J. (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. *Genes Dev* **15**, 1985-97.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 725-749.
- Gonzalez-Carranza, Z. H., Lozoya-Gloria, E., and Roberts, J. A. (1998). Recent developments in abscission: Shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science* **3**, 10-14.
- Guo, H., and Ecker, J. R. (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-77.
- Habu, Y., Fukada-Tanaka, S., Hisatomi, Y., and Iida, S. (1997). Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 516-21.
- Halford, N. G., and Hardie, D. G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* **37**, 735-48.
- Halford, N. G., Hey, S., Jhureea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M., and Zhang, Y. H. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany* **54**, 467-475.
- Harren, F. J. M., Bijnen, F. G. C., Reuss, J., Voeselek, L. A. C. J., and Blom, C. W. P. M. (1990a). Sensitive Intracavity Photoacoustic Measurements with a CO<sub>2</sub> Wave-Guide Laser. *Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry* **50**, 137-144.
- Harren, F. J. M., Reuss, J., and Lenz, F. (1997). Photoacoustic detection of current ethylene evolution in citrus flowers by modern laser techniques. *Gartenbauwissenschaft* **62**, 193-196.
- Harren, F. J. M., Reuss, J., Woltering, E. J., and Bicanic, D. D. (1990b). Photoacoustic Measurements of Agriculturally Interesting Gases and Detection of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> Below the Ppb Level. *Applied Spectroscopy* **44**, 1360-1368.

- Hartman, J. J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R. D., and McNally, F. J. (1998). Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* **93**, 277-87.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., and de Vries, S. C. (2001). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**, 803-16.
- Hong, S. B., Sexton, R., and Tucker, M. L. (2000). Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol* **123**, 869-81.
- Hong, Z., Delauney, A. J., and Verma, D. P. (2001). A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* **13**, 755-68.
- Ikonomov, O. C., and Jacob, M. H. (1996). Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate- to low-abundance in a microscopic system. *Biotechniques* **20**, 1030-4, 1036-8, 1040-2.
- Ivashuta, S., Imai, R., Uchiyama, K., and Gau, M. (1999). The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. *Mol Biotechnol* **12**, 137-41.
- Jackson, M. B., and Osborne, D. J. (1970). Ethylene, the natural regulator of leaf abscission. *Nature* **225**, 1019-22.
- Jaffe, M. L. G., R. (1979). Auxin and the early stages of the abscission process of Citrus leaf explants. *Botanical Gazette* **140**, 378-383.
- Jinn, T. L., Stone, J. M., and Walker, J. C. (2000). HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* **14**, 108-17.
- Jones, C. S., Davies, H. V., and Taylor, M. A. (2000). Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta* **211**, 708-14.

- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., and de Vries, S. (2006). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* **18**, 626-38.
- Kasajima, I., Ohkama-Ohtsu, N., Ide, Y., Hayashi, H., Yoneyama, T., Suzuki, Y., Naito, S., and Fujiwara, T. (2007). The BIG gene is involved in regulation of sulfur deficiency-responsive genes in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **129**, 351-363.
- Kitagawa, Y. K., Y.; Yamaki, S. (1995). Isolation of beta-galactosidase fractions from Japanese pear: Activity against native cell wall polysaccharides. *Physiologia Plantarum* **93**, 545-550.
- Kiyosue, T., Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochim Biophys Acta* **1370**, 187-91.
- Klee, H. J. (2002). Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *J Exp Bot* **53**, 2057-63.
- Kotake, T., Yamaguchi, D., Ohzono, H., Hojo, S., Kaneko, S., Ishida, H. K., and Tsumuraya, Y. (2004). UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *J Biol Chem* **279**, 45728-36.
- Lashbrook, C. C., Tieman, D. M., and Klee, H. J. (1998). Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J* **15**, 243-52.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.
- Linskens, M. H., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D., and Villeponteau, B. (1995). Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **23**, 3244-51.
- Litterer, L. A., Schnurr, J. A., Plaisance, K. L., Storey, K. K., Gronwald, J. W., and Somers, D. A. (2006). Characterization and expression of Arabidopsis UDP-sugar pyrophosphorylase. *Plant Physiol Biochem* **44**, 171-80.
- Luckwill, L. (1953). Studies of fruit development in relation to plant hormones. I Hormone production by the developing apple seed to fruit drop. *Journal of Horticulture Science* **28**, 14-24.

- Luda, B. D., J.; Ledesma, A.; Chenchik, A.; Siebert, P.D. (1996). Combining the technique of RNA fingerprint and Differential Display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 824-828.
- Luquez, V. M., and Guamet, J. J. (2002). The stay green mutations d1 and d2 increase water stress susceptibility in soybeans. *J Exp Bot* **53**, 1421-8.
- Luschnig, C. (2001). Auxin transport: why plants like to think BIG. *Curr Biol* **11**, R831-3.
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H. W., Budiman, M. A., Szymkowiak, E. J., Irish, E. E., and Wing, R. A. (2000). JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* **406**, 910-3.
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J. M., Debeaujon, I., and Klein, M. (2007). The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup> -antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* **19**, 2023-38.
- Martin, K. J., and Pardee, A. B. (1999). Principles of differential display. *Methods Enzymol* **303**, 234-58.
- Matz, M. V., and Lukyanov, S. A. (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res* **26**, 5537-43.
- McManus, M. T. (2007). Further examination of abscission zone cells as ethylene target cells in higher plants. *Ann Bot (Lond)* **101**, 285-92.
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, C., Peumans, W. J., Barre, A., Van Damme, E. J., and Rouge, P. (2003). A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* **85**, 123-31.
- Mutlu, A. G., S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum* **105**, 569-576.
- Oka, T., Nemoto, T., and Jigami, Y. (2007). Functional analysis of Arabidopsis thaliana RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-D-glucose to UDP-L-rhamnose conversion. *J Biol Chem* **282**, 5389-403.
- Osborne, D. J. (1977). Ethylene and target cells in the growth of plants. *Science progress* **64**, 51-63.

- Osborne, D. J., and Sargent, J. A. (1976). Positional Differentiation of Ethylene-Responsive Cells in Rachis Abscission Zones in Leaves of *Sambucus-Nigra* and Their Growth and Ultrastructural Changes at Senescence and Separation. *Planta* **130**, 203-210.
- Osborne, D. J. M., M.T. (2005). Hormones, signals and target cells in plant development. *Cambridge University Press*.
- Pak, C. v. D., W. G. (2005). Delay of Iris flower senescence by protease inhibitor. *New Phytologist* **165**, 473-480.
- Pandita, V. K., and Jindal, K. K. (1991). Enzymatic and Anatomical Changes in Abscission Zone Cells of Apple Fruits Induced by Ethephon. *Biologia Plantarum* **33**, 20-&.
- Patterson, S. E. (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**, 494-500.
- Patterson, S. E., and Bleecker, A. B. (2004). Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**, 194-203.
- Polge, C., and Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci* **12**, 20-8.
- Prashar, Y., and Weissman, S. M. (1996). Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 659-63.
- Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popeijus, H., van der Voort, J. R., Groenink, W., van Koert, P., Schots, A., Bakker, J., and Smant, G. (2000). An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 830-6.
- Quint, M., Ito, H., Zhang, W., and Gray, W. M. (2005). Characterization of a novel temperature-sensitive allele of the CUL1/AXR6 subunit of SCF ubiquitin-ligases. *Plant J* **43**, 371-83.
- Quirino, B. F., Reiter, W. D., and Amasino, R. D. (2001). One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology* **46**, 447-457.

- Ramina, A. R., N.; Masia, A. (1989). The abscission process in peach: structural, biochemical and hormonal aspect. *In* "Cell separation in plants" (D. J. J. Osborne, M.B., Ed.), pp. 223-240. Springer Verlag.
- Rasori, A., Ruperti, B., Bonghi, C., Tonutti, P., and Ramina, A. (2002). Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *J Exp Bot* **53**, 2333-9.
- Ratner, A., Goren, R., and Monselise, S. P. (1969). Activity of Pectin Esterase and Cellulase in the Abscission Zone of Citrus Leaf Explants. *Plant Physiol* **44**, 1717-1723.
- Ren, G., An, K., Liao, Y., Zhou, X., Cao, Y., Zhao, H., Ge, X., and Kuai, B. (2007). Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 1429-41.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., and Gutierrez-Adan, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* **66**, 589-95.
- Roberts, J. A., Elliott, K. A., and Gonzalez-Carranza, Z. H. (2002). Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 131-158.
- Roberts, J. A., Whitelaw, C. A., Gonzalez-Carranza, Z. H., and McManus, M. T. (2000). Cell separation processes in plants - Models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany* **86**, 223-235.
- Roberts, J. A. S., C.B; Tucker, G.A. (1984). Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. *Planta* **160**, 159-163.
- Ross, G. S., Wegrzyn, T., MacRae, E. A., and Redgwell, R. J. (1994). Apple beta-galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol* **106**, 521-8.
- Rotari, V. I. H., R.; Gallois, P. (2005). Death by proteases in plants: whodunit. *Physiologia Plantarum* **123**, 376-385.
- Ruperti, B., Bonghi, C., Tonutti, P., and Ramina, A. (1998). Ethylene biosynthesis in peach fruitlet abscission. *Plant Cell and Environment* **21**, 731-737.

- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., and Paul, M. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6849-54.
- Sexton, R., and Roberts, J. A. (1982). Cell Biology of Abscission. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **33**, 133-162.
- Shimkets, R. A., Lowe, D. G., Tai, J. T., Sehl, P., Jin, H., Yang, R., Predki, P. F., Rothberg, B. E., Murtha, M. T., Roth, M. E., Shenoy, S. G., Windemuth, A., Simpson, J. W., Simons, J. F., Daley, M. P., Gold, S. A., McKenna, M. P., Hillan, K., Went, G. T., and Rothberg, J. M. (1999). Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nat Biotechnol* **17**, 798-803.
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L., and Seguin, A. (2005). CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 2059-76.
- Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T. C., Tenen, D. G., and Danna, K. J. (1995). Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res* **23**, 4738-9.
- Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P., and Trost, P. (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**, 840-50.
- Stenvik, G. E., Butenko, M. A., Urbanowicz, B. R., Rose, J. K., and Aalen, R. B. (2006). Overexpression of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION activates cell separation in vestigial abscission zones in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1467-76.
- Stepanova, A. N., and Alonso, J. M. (2005). Ethylene signaling pathway. *Sci STKE* **2005**, cm3.
- Sun, Y., Hegamyer, G., and Colburn, N. H. (1994). Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res* **54**, 1139-44.
- Sutcliffe, J. G., Foye, P. E., Erlander, M. G., Hilbush, B. S., Bodzin, L. J., Durham, J. T., and Hasel, K. W. (2000). TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1976-81.

- Szymkowiak, E. J., and Irish, E. E. (1999). Interactions between jointless and wild-type tomato tissues during development of the pedicel abscission zone and the inflorescence meristem. *Plant Cell* **11**, 159-75.
- Tai, W. C., and Banfield, D. K. (2001). AtBS14a and AtBS14b, two Bet1/Sft1-like SNAREs from *Arabidopsis thaliana* that complement mutations in the yeast SFT1 gene. *FEBS Lett* **500**, 177-82.
- Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005). KATAMARI1/MURUS3 Is a novel golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1764-76.
- Tateishi, A., Inoue, H., Shiba, H., and Yamaki, S. (2001). Molecular cloning of beta-galactosidase from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) and its gene expression with fruit ripening. *Plant Cell Physiol* **42**, 492-8.
- Taylor, J. E., and Whitelaw, C. A. (2001). Signals in abscission. *New Phytologist* **151**, 323-339.
- Taylor, J. T., GA; Lasslett, Y; Smith, CJS; Arnold, CM; Watson, CF; Schuch, W; Grierson, D; Roberts, JA. (1990). Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants. *Planta* **183**, 133-138.
- Thompson, D. S., and Osborne, D. J. (1994). A Role for the Stele in Intertissue Signaling in the Initiation of Abscission in Bean Leaves (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* **105**, 341-347.
- Trainotti, L., Spolaore, S., Ferrarese, L., and Casadoro, G. (1997). Characterization of ppEG1, a member of a multigene family which encodes endo-beta-1,4-glucanase in peach. *Plant Mol Biol* **34**, 791-802.
- Verma, D. P., and Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* **47**, 693-701.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., and Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521-31.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-14.

- Wang, Z., Yuan, Z., and Quebedeaux, B. (1998). Photoperiod alters partitioning of newly-fixed <sup>14</sup>C and reserve carbon into sorbitol, sucrose and starch in apple leaves, stems, and roots. *Functional Plant Biology*. **25**, 503-506.
- Wertheim, S. (2000). Development in the chemical thinning of apple and pear. *Plant Growth Regulation* **31**, 85-100.
- Whitelaw, C. A. P., W.; Jenkins, E; Taylor, V.; Roberts, J. (1999). An mRNA encoding a response regulator protein from Brassica napus is up-regulated during pod development. *Journal of Experimental Botany* **50**, 335-341.
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleecker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M., and Klee, H. J. (1997). A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat Biotechnol* **15**, 444-7.
- Wright, M., and Osborne, D. J. (1974). Abscission in Phaseolus-Vulgaris Positional Differentiation and Ethylene-Induced Expansion Growth of Specialized Cells. *Planta* **120**, 163-170.
- Wu, Z., and Burns, J. K. (2004). A beta-galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (Citrus sinensis). *J Exp Bot* **55**, 1483-90.
- Yu, Y. H., Xia, X. L., Yin, W. L., and Zhang, H. C. (2007). Comparative genomic analysis of CIPK gene family in Arabidopsis and Populus. *Plant Growth Regulation* **52**, 101-110.
- Zhang, J. S., Duncan, E. L., Chang, A. C., and Reddel, R. R. (1998). Differential display of mRNA. *Mol Biotechnol* **10**, 155-65.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-32.



**Allegato A - Tabella A.1: lista dei cloni individuati con il cDNA-AFLP in *Malus domestica*. Risultati ottenuti tramite ricerca con BLASTX per *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*.**

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                             |                |           | <i>Oryza sativa</i> |                                             |                |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------|----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                    | e-<br>val<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                    | e-<br>val<br>e |  |
| C001  | DY241890               | 36048257 | Up          | NM_103972                   | serine/threonine protein kinase ATPK10                      | 5.00<br>E-35   | AT1G50920 | BAD35220            | putative nucleolar GTP-binding protein      | 6.00<br>E-41   |  |
| C002  | DY241893               | 36048260 | Up          | CAB38828                    | putative proton pump                                        | 1.00<br>E-36   | AT4G39080 | AAL78104            | Putative proton pump [Oryza sativa]         | 4.00<br>E-38   |  |
| C003  | DY241895               | 36048262 | Up          | NP_177412                   | oxidoreductase/oxidoreductase, acting on the CH-OH group of | 3.00<br>E-06   | AT1G72680 | ABG65973            | mannitol dehydrogenase                      | 2.00<br>E-04   |  |
| C004  | DY241899               | 36048266 | Up          | AY288079                    | NAD or NADP as acceptor / zinc ion binding                  | 2.00<br>E-06   | At1g72680 | NM_195328           | similar to cinnamyl alcohol dehydrogenase   | 1.00<br>E-04   |  |
| C005  | DY241901               | 36048268 | Up          | BAA97423                    | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase                   | 2.00<br>E-38   | AT5g43440 | BAD05360            | putative 2-oxoglutarate-dependent oxygenase | 9.00<br>E-30   |  |
| C007  | DY241904               | 36048271 | Up          | AAM18495                    | putative enoyl-CoA hydratase                                | 1.00<br>E-06   | AT4G16800 | CAC39053            | putative enoyl-CoA hydratase                | 4.00<br>E-17   |  |
| C008  | DY241906               | 36048273 | Up          | NP_194171                   | CBL-interacting protein kinase 8 (CIPK8)                    | 1.00<br>E-36   | AT4G24400 | BAD87720            | putative serine/threonine kinase            | 2.00<br>E-30   |  |
| C009  | DY241891               | 36048258 | Up          | BAF01964                    | hypothetical protein                                        | 9.00<br>E-40   |           |                     |                                             |                |  |
| C010  | DY242184               | 36048551 | Up          | BAF00779                    | serine/threonine protein kinase ATPK10                      | 4.00<br>E-15   | AT5G58380 | BAC79539            | putative Serine/threonine Kinase            | 3.00<br>E-15   |  |
| C011  | DY241896               | 36048263 | Up          | AAK25938                    | putative glutathione reductase                              | 2.00<br>E-05   | AT3G24170 | BAA11214            | Glutathione Reductase                       | 1.00<br>E-04   |  |
| C012  | ES605471               | 46801174 | Up          | NM_114734                   | cell division control protein 2 homolog A (CDC2A)           | 3.00<br>E-26   | AT3G48750 | XM_463932           | p34cdc2                                     | 3.00<br>E-26   |  |
| C013  | DY242174               | 36048541 | Up          | NP_189034                   | beta-amylase                                                | 1.00<br>E-44   | AT3G23920 | ABF93905            | Beta-amylase, putative                      | 8.00<br>E-42   |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                         |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                            |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                   | e-<br>valu<br>e |  |
| C014  | DY241902               | 36048269 | Up          | Q9M2J9                      | Bet1-like SNARE 1-1                                     | 2.00<br>E-23    | AT3G58170 | BAD22877            | putative Bet1/Sft1-related SNARE           | 2.00<br>E-21    |  |
| C016  | DY241907               | 36048274 | Up          | NP_194171                   | CIPK8 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 8)                | 3.00<br>E-37    | AT4G24400 | BAD87720            | putative serine/threonine kinase           | 8.00<br>E-31    |  |
| C019  | DY241897               | 36048264 | Up          | NP_565197                   | HAC1; transcription cofactor                            | 1.00<br>E-37    | AT1G79000 | BAD10378            | putative HAC5                              | 1.00<br>E-35    |  |
| C021  | DY241900               | 36048267 | Up          | AAL25566                    | putative protein                                        | 2.00<br>E-17    | AT5G02020 | NM_190608           | P0005H10.22 [ <i>Oryza sativa</i> ]        | 8.00<br>E-04    |  |
| C023  | DY241905               | 36048272 | Up          | NP_188065                   | ATP binding                                             | 2.00<br>E-09    | AT3G14470 | ABF95702            | NB-ARC domain containing protein           | 5.00<br>E-11    |  |
| C024  | DY241908               | 36048275 | Up          | BAB01244                    | unnamed protein product [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] | 1.00<br>E-17    |           | ABF94646            | pentatricopeptide                          | 2.00<br>E-19    |  |
| C026  | DY241921               | 36048288 | Up          | AAK96884                    | beta tubulin                                            | 3.00<br>E-50    | AT5G23860 | CAA55021            | beta tubulin                               | 3.00<br>E-50    |  |
| C027  | DY241931               | 36048298 | Up          | CAB89316                    | serine carboxypeptidase III, putative                   | 2.00<br>E-26    | AT3G45010 | BAA01757            | Serine carboxypeptidase III precursor      | 2.00<br>E-23    |  |
| C029  | DY241952               | 36048319 | Up          | NP_671779                   | expressed protein                                       | 1.00<br>E-13    | AT2G04865 |                     |                                            |                 |  |
| C030  | DY241963               | 36048330 | Up          | NP_191049                   | LHCA1; chlorophyll binding                              | 3.00<br>E-38    | AT3G54890 | AAC67558            | chlorophyll a/b-binding protein precursor  | 3.00<br>E-37    |  |
| C031  | DY241972               | 36048339 | Up          | AAM77595                    | auxin transport protein; BIG                            | 3.00<br>E-34    | AT3G02260 |                     |                                            |                 |  |
| C032  | DY241982               | 36048349 | Up          | BAD94395                    | hypothetical protein                                    | 5.00<br>E-10    | At4g17110 | BAD19476            | vacuolar protein sorting 13C protein-like  | 4.00<br>E-38    |  |
| C033  | DY241910               | 36048277 | Up          | BAB09990                    | axi 1 (auxin-independent growth promoter)-like protein  | 2.00<br>E-13    | AT5G35570 | BAD38083            | putative auxin-independent growth promoter | 1.00<br>E-14    |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                     |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                   |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                            | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                          | e-<br>valu<br>e |  |
| C036  | DY241942               | 36048309 | Down        | BAF02015                    | maturase                                            | 6.00<br>E-26    |           |                     |                                                   |                 |  |
| C037  | DY241953               | 36048320 | Up          | BAD94167                    | multi-drug resistance protein                       | 1.00<br>E-25    | At1g04120 | ABF93919            | ABC transporter family protein                    | 9.00<br>E-22    |  |
| C038  | DY241964               | 36048331 | Up          | BAF01061                    | putative trehalose-6-phosphate synthase             | 2.00<br>E-51    | AT1G60140 | XM_468201           | putative alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase | 3.00<br>E-48    |  |
| C039  | DY241973               | 36048340 | Up          | CAB45812                    | UDP-glucose 4-epimerase-like protein                | 7.00<br>E-29    | AT4G20460 | Q8H930              | Probable UDP-arabinose 4-epimerase 1              | 4.00<br>E-27    |  |
| C041  | DY241911               | 36048278 | Up          | AAS49037                    | expressed protein                                   | 3.00<br>E-17    | AT1G31870 | XM_480358           | expressed protein                                 | 5.00<br>E-22    |  |
| C043  | DY241932               | 36048299 | Up          | NP_192938                   | ATP binding / transmembrane receptor                | 1.00<br>E-06    | AT4G12010 |                     |                                                   |                 |  |
| C044  | DY241943               | 36048310 | Up          | BAF01964                    | hypothetical protein                                | 1.00<br>E-42    |           |                     |                                                   |                 |  |
| C046  | DY241965               | 36048332 | Up          | BAD93968                    | ARF1-binding protein                                | 1.00<br>E-06    | At5g62010 |                     |                                                   |                 |  |
| C049  | DY241912               | 36048279 | Up          | AAK60331                    | AT3g29575/MWE13_2                                   | 1.00<br>E-05    | AT3g29575 |                     |                                                   |                 |  |
| C050  | DY241923               | 36048290 | Up          | NP_199342                   | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein | 2.00<br>E-08    | AT5G45290 | BAD36057            | zinc finger protein-like                          | 6.00<br>E-23    |  |
| C051  | DY241933               | 36048300 | Up          | AAF27006                    | UDP-glucose:sterol glucosyltransferase              | 4.00<br>E-45    | AT3g07020 | BAC15827            | putative UDP-glucose:sterol glucosyltransferase   | 4.00<br>E-45    |  |
| C052  | DY241944               | 36048311 | Up          | BAF01964                    | hypothetical protein                                | 1.00<br>E-09    |           |                     |                                                   |                 |  |
| C053  | DY241955               | 36048322 | Up          | NM_102924                   | expressed protein                                   | 7.00<br>E-17    | AT1G31870 | XM_480358           | expressed protein                                 | 8.00<br>E-21    |  |

|       |                        |          |             | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                     |           |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                              |           |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|--|
| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | Numero Annotazione          | Funzione                                            | e-valuate | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                     | e-valuate |  |
| C101  | DY241989               | 36048356 | Up          | NM_119048                   | 26S proteasome AAA-ATPase subunit (RPT2a)           | 6.00 E-75 | AT4G29040 | AB037154            | 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit2b | 1.00 E-74 |  |
| C102  | DY241920               | 36048287 | Up          | AY084472                    | unnamed protein product                             | 2.00 E-27 |           | XM_474364           | OSJNBb0017I01.5                                              | 5.00 E-25 |  |
| C103  | DY241930               | 36048297 | Down        | NP_190446                   | DNA binding                                         | 2.00 E-11 | AT3G48770 | EAZ18499            | hypothetical protein OsJ_032708                              | 4.00 E-09 |  |
| C104  | DY241990               | 36048357 | Up          | NP_198961                   | transferase, transferring glycosyl groups           | 5.00 E-23 | At5g41460 | AAP54798            | fringe protein, putative                                     | 4.00 E-17 |  |
| C105  | DY241940               | 36048307 | Down        | NP_200230                   | PORA; oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase | 1.00 E-25 | AT5G54190 | AAL58280            | putative dehydrogenase                                       | 1.00 E-21 |  |
| C106  | DY241951               | 36048318 | Down        | NM_121289                   | 2-oxoglutarate/malate translocator precursor-like   | 7.00 E-64 | AT5G12860 | XM_483000           | putative glutamate/malate translocator                       | 3.00 E-27 |  |
| C109  | DY241981               | 36048348 | Up          | NM_121321                   | NAM-like protein [Arabidopsis thaliana]             | 2.00 E-07 | AT5G13180 | AB182278            | ONAC300 [Oryza sativa]                                       | 0.5       |  |
| C112  | DY241991               | 36048358 | Down        | NM_124635                   | UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase-related   | 1.00 E-76 | AT5G52560 | AP003726            | UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase-like               | 2.00 E-65 |  |
| C114  | DY242000               | 36048367 | Down        | NM_180157                   | Snf1-related protein kinase (KIN10) (SKIN10)        | 2.00 E-31 | AT3G01090 | XM_475738           | putative protein kinase                                      | 3.00 E-23 |  |
| C115  | DY242009               | 36048376 | Down        | NP_191462                   | TT12 (TRANSPARENT TESTA 12)                         | 9.00 E-69 | AT3G59030 | ABA99853            | TRANSPARENT TESTA 12 protein, putative                       | 7.00 E-55 |  |
| C117  | DY242017               | 36048384 | Up          | AY085603                    | cytochrome b561                                     | 2.00 E-32 | AT4g25570 | XM_466997           | putative cytochrome                                          | 4.00 E-29 |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                  |           |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                                    |           |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                         | e-valuate | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                           | e-valuate |
| C118  | DY242027               | 36048394 | Up          | NM_112981                   | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative / hnRNP,       | 5.00 E-17 | AT3G20890 | ABA91392            | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative, expressed       | 2.00 E-10 |
| C120  | DY242045               | 36048412 | Up          | Q944P7                      | Leucine aminopeptidase 3                                         | 2.00 E-58 | AT4G30920 | BAD19264            | putative leucine aminopeptidase                                    | 6.00 E-52 |
| C121  | DY242053               | 36048420 | Down        | CAA51171                    | tonoplast intrinsic protein gamma (gamma-TIP)                    | 8.00 E-71 | AT3G26520 | P50156              | Probable aquaporin TIP1.1                                          | 8.00 E-68 |
| C124  | DY242001               | 36048368 | Up          |                             |                                                                  |           |           | XM_467700           | putative potyviral helper component protease-interacting protein 2 | 4.3       |
| C126  | DY242018               | 36048385 | Down        | CAC85266                    | SGT1-like protein                                                | 2.00 E-28 | AT4G11260 | BAD73077            | SGT1-like protein                                                  | 8.00 E-18 |
| C127  | DY242028               | 36048395 | Up          | NM_123542                   | cell cycle control crn (crooked neck) protein-like               | 3.00 E-61 | AT5G41770 | XM_475092           | putative crooked neck protein                                      | 8.00 E-53 |
| C129  | DY242038               | 36048405 | Up          | NM_118709                   | expressed protein                                                | 1.00 E-27 | AT4G25770 | AC135228            | putative serine esterase                                           | 8.00 E-21 |
| C131  | DY242046               | 36048413 | Down        | AAB69385                    | sigma factor 2                                                   | 5.00 E-34 | AT1G08540 | AC147925            | Sigma-70 region 3, putative                                        | 3.00 E-25 |
| C132  | DY242054               | 36048421 | Down        |                             |                                                                  |           |           | XM_483368           | auxin response factor 7b                                           | 1.00 E-08 |
| C133  | DY241993               | 36048360 | Up          | NP_850663                   | ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)                                          | 1.00 E-79 | AT3G47340 | Q43011              | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]                      | 5.00 E-69 |
| C135  | DY242010               | 36048377 | Down        | NM_106504                   | Probable rhamnose biosynthetic enzyme 1                          | 2.00 E-76 | AT1G78570 | AP005823            | dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase-like [ <i>Oryza sativa</i> ]        | 1.00 E-63 |
| C137  | DY242019               | 36048386 | Down        | NM_113572                   | eukaryotic release factor 1 family protein / eRF1 family protein | 0.00 9    | AT3G26618 | XM_469434           | eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3 (eRF1-3)       | 0.00 3    |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                      |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                             |                 |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                             | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                    | e-<br>valu<br>e |
| C140  | DY242029               | 36048396 | Up          | NP_850154                   | HVT1 (HELICASE IN VASCULAR TISSUE AND TAPETUM)                       | 9.00<br>E-29    | AT2G30800 | BAD53353            | putative DEIH-box RNA/DNA helicase                          | 3.00<br>E-35    |
| C142  | DY242039               | 36048406 | Down        | NP_973600                   | ATP binding                                                          | 7.00<br>E-26    | AT2G34560 | BAD73312            | vacuolar protein sorting factor 4B-like                     | 7.00<br>E-17    |
| C145  | DY242055               | 36048422 | Up          | AL161515                    | neutral invertase like protein                                       | 2.00<br>E-38    | AT4g09510 | AP004775            | putative alkaline/neutral invertase [ <i>Oryza sativa</i> ] | 6.00<br>E-34    |
| C149  | DY242011               | 36048378 | Up          | NP_195626                   | heat shock protein binding                                           | 5.00<br>E-27    | AT4G39150 | AAU43976            | putative DnaJ [ <i>Oryza sativa</i> ]                       | 3.00<br>E-24    |
| C160  | DY242020               | 36048387 | Down        | NM_101054                   | glycosyl hydrolase family 17 protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] | 2.00<br>E-61    | At1g11820 | XM_478343           | putative beta-1,3-glucanase                                 | 3.00<br>E-48    |
| C162  | DY242040               | 36048407 | Up          | NM_111245                   | speckle-type POZ protein-related                                     | 5.00<br>E-51    | AT3G03740 | NM_186474           | putative zinc finger POZ domain protein                     | 6.00<br>E-52    |
| C163  | DY242047               | 36048414 | Up          | AAM20498                    | calmodulin-related protein, putative                                 | 6.00<br>E-25    | AT3G50770 | NM_191374           | calmodulin-like protein                                     | 9.00<br>E-19    |
| C164  | DY242056               | 36048423 | Down        | NM_102924                   | expressed protein                                                    | 8.00<br>E-18    | AT1G31870 | XM_480358           | expressed protein                                           | 5.00<br>E-22    |
| C166  | DY242003               | 36048370 | Up          | BAF01964                    | hypothetical protein                                                 | 5.00<br>E-42    |           |                     |                                                             |                 |
| C167  | DY242012               | 36048379 | Up          | NM_125285                   | protein-tyrosine kinase                                              | 2.00<br>E-66    | AT5G58950 | NM_188291           | putative protein kinase                                     | 6.00<br>E-53    |
| C168  | DY242021               | 36048388 | Up          | BAF01373                    | putative acetyltransferase                                           | 3.00<br>E-72    | AT4G01130 | BAA81842            | putative lanatoside 15'-O-acetylerase                       | 1.00<br>E-57    |
| C169  | DY242031               | 36048398 | Down        | NM_102924                   | unknown protein                                                      | 6.00<br>E-55    | AT1G31870 | EAY87887            | hypothetical protein OsI_009120                             | 4.00<br>E-50    |
| C170  | DY242041               | 36048408 | Up          |                             |                                                                      |                 |           | AC097277            | putative glycine rich protein                               | 0.00<br>3       |
| C172  | DY242057               | 36048424 | Down        | NM_116096                   | ATP-dependent RNA helicase-like protein                              | 2.00<br>E-15    | AT3G62310 | XM_465115           | putative RNA helicase                                       | 0.00<br>5       |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                  |                |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                          |                |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                         | e-<br>val<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                 | e-<br>val<br>e |  |
| C175  | DY242004               | 36048371 | Up          | NM_202252                   | ABA-responsive element binding protein 1 (AREB1)                 | 0.00<br>2      | At1g45249 | NP_001043078        | Os01g0375200                                             | 6.8            |  |
| C176  | DY242013               | 36048380 | Up          | NM_102497                   | expressed protein                                                | 3.00<br>E-14   | AT1G27350 | XM_478899           | unknown protein [ <i>Oryza sativa</i> ]                  | 3.00<br>E-09   |  |
| C177  | DY242022               | 36048389 | Up          | NM_128085                   | expressed protein                                                | 2.00<br>E-53   | AT2G25280 | XM_481398           | unknown protein                                          | 2.00<br>E-52   |  |
| C178  | DY242032               | 36048399 | Up          | NC_000932                   | cytochrome f                                                     | 5.00<br>E-37   | AtCg00540 | NM_195994           | putative cytochrome f from chromosome 10 chloroplast     | 2.00<br>E-37   |  |
| C181  | DY242049               | 36048416 | Up          | NM_117815                   | expressed protein                                                | 5.00<br>E-19   | AT4G17110 | NM_197784           | expressed protein                                        | 8.00<br>E-09   |  |
| C182  | DY242058               | 36048425 | Down        | NM_126017                   | ferredoxin--NADP(+) reductase, putative / adrenodoxin reductase, | 8.00<br>E-49   | AT5G66190 | NM_185345           | putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase               | 1.00<br>E-46   |  |
| C183  | DY241997               | 36048364 | Down        | NM_126017                   | ferredoxin--NADP(+) reductase, putative / adrenodoxin reductase, | 1.00<br>E-49   | AT5G66190 | NM_185345           | putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase               | 5.00<br>E-47   |  |
| C186  | DY242014               | 36048381 | Down        | NM_120449                   | trihelix DNA-binding protein, putative                           | 4.00<br>E-39   | AT5G03680 | NM_197355           | putative transcription factor                            | 7.00<br>E-24   |  |
| C188  | DY242023               | 36048390 | Down        | NM_128430                   | expressed protein                                                | 1.00<br>E-14   | AT2G28690 | XM_471236           | OSJNBa0095E20.10                                         | 6.00<br>E-10   |  |
| C189  | DY242033               | 36048400 | Up          | NM_115383                   | expressed protein                                                | 2.00<br>E-44   | AT3G55250 | AC109596            | unknown protein                                          | 1.00<br>E-41   |  |
| C190  | DY242042               | 36048409 | Up          | NM_128610                   | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein              | 2.00<br>E-10   | AT2G30580 | AC145780            | Zinc finger, C3HC4 type (RING finger) containing protein | 9.00<br>E-11   |  |
| C191  | DY242120               | 36048487 | Up          | NM_125967                   | leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative       | 6.00<br>E-35   | AT5G65700 | XM_476541           | putative OsLRK1(receptor-type protein kinase)            | 3.00<br>E-32   |  |
| C197  | DY242142               | 36048509 | Up          | NM_121492                   | Potassium transporter 8 (AtPOT8) (AtHAK8)                        | 1.00<br>E-35   | AT5G14880 | XM_467613           | putative potassium transporter HAK2p                     | 3.00<br>E-24   |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                        |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                  |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                               | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                         | e-<br>valu<br>e |  |
| C198  | DY242068               | 36048435 | Up          | NM_126017                   | ferredoxin--NADP(+)<br>reductase, putative /<br>adrenodoxin reductase, | 3.00<br>E-50    | AT5G66190 | NM_185345           | putative ferredoxin-<br>NADP(H) oxidoreductase   | 1.00<br>E-47    |  |
| C202  | DY242089               | 36048456 | Up          | NM_114664                   | ATPase, plasma<br>membrane-type, putative<br>/ proton pump, putative   | 1.00<br>E-46    | AT3G47950 | XM_476966           | plasma membrane H+<br>ATPase                     | 1.00<br>E-47    |  |
| C203  | DY242100               | 36048467 | Down        | NM_122419                   | endomembrane protein<br>70, putative                                   | 7.00<br>E-54    | AT5G25100 | XM_483721           | putative PHG1A protein                           | 3.00<br>E-55    |  |
| C205  | DY242110               | 36048477 | Up          | NM_148703                   | Unknown protein                                                        | 2.00<br>E-22    | AT3G10405 | NM_197609           | unknown protein                                  | 1.00<br>E-21    |  |
| C208  | DY242132               | 36048499 | Up          | NM_119148                   | subtilase family protein                                               | 1.00<br>E-66    | AT4G30020 | AP004278            | putative meiotic serine<br>proteinase            | 2.00<br>E-59    |  |
| C209  | DY242154               | 36048521 | Down        | NM_125995                   | auxin:hydrogen<br>symporter                                            | 7.00<br>E-33    | AT5G65980 | NM_191091           | P0454H12.16                                      | 4.00<br>E-12    |  |
| C210  | DY242079               | 36048446 | Down        | NM_127756                   | putative ATP synthase                                                  | 4.00<br>E-25    | AT2G21870 | XM_464007           | putative ATP synthase                            | 8.00<br>E-23    |  |
| C211  | DY242090               | 36048457 | Up          | NP_566016                   | ATCS; citrate (SI)-<br>synthase                                        | 2.00<br>E-48    | AT3G60100 | DP000010            | citrate synthase                                 | 1.00<br>E-47    |  |
| C213  | DY242101               | 36048468 | Down        | AK228963                    | putative glucan synthase                                               | 5.00<br>E-09    | AT2G31960 | BAD62105            | putative callose synthase<br>1 catalytic subunit | 4.00<br>E-08    |  |
| C214  | DY242111               | 36048478 | Up          | AL161556                    | symbiosis-related like<br>protein                                      | 0.01<br>6       |           | EAZ05867            | hypothetical protein<br>OsI_027099               | 3.00<br>E-07    |  |
| C221  | DY242144               | 36048511 | Up          | NP_195311                   | ATGB2 (GTP-BINDING<br>2); GTP binding                                  | 6.00<br>E-34    | AT4G17170 | XM_466431           | putative GTP-binding<br>protein yptm3            | 3.00<br>E-31    |  |
| C222  | DY242069               | 36048436 | Down        | NM_127756                   | Probable ATP synthase 24<br>kDa subunit                                | 4.00<br>E-09    | AT2G21870 | XM_464007           | putative ATP synthase                            | 9.00<br>E-10    |  |
| C223  | DY242080               | 36048447 | Down        | NM_179852                   | heat shock protein 70<br>family protein / HSP70<br>family protein      | 3.00<br>E-19    | AT2G32120 | EAY89062            | hypothetical protein<br>OsI_010295               | 8.00<br>E-22    |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                    |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                            |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                           | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                   | e-<br>valu<br>e |  |
| C228  | DY242112               | 36048479 | Up          | NM_129998                   | citrate synthase, mitochondrial, putative                          | 1.00 E-48       | AT2G44350 | XM_464443           | citrate synthase                           | 2.00 E-47       |  |
| C232  | DY242133               | 36048500 | Up          | NM_104780                   | glycine cleavage T family protein / aminomethyl transferase family | 2.00 E-28       | At1g60990 |                     |                                            |                 |  |
| C233  | DY242145               | 36048512 | Down        | NM_127756                   | putative ATP synthase                                              | 2.00 E-17       | AT2G21870 | XM_464007           | putative ATP synthase                      | 5.00 E-17       |  |
| C234  | DY242070               | 36048437 | Up          | NM_102927                   | GHMP kinase family protein                                         | 3.00 E-14       | AT1G31910 |                     |                                            |                 |  |
| C235  | DY242081               | 36048448 | Up          | NM_105441                   | b-keto acyl reductase, putative (GLOSSY8)                          | 8.00 E-15       | AT1G67730 | EAY86544            | hypothetical protein OsI_007777            | 6.00 E-09       |  |
| C236  | DY242091               | 36048458 | Up          | NM_125285                   | protein-tyrosine kinase                                            | 2.00 E-67       | AT5G58950 | NM_188291           | putative protein kinase                    | 8.00 E-53       |  |
| C240  | DY242113               | 36048480 | Down        | NM_128068                   | MIR domain-containing protein                                      | 7.00 E-29       | AT2G25110 | XM_481233           | Stromal cell-derived factor 2-like protein | 2.00 E-22       |  |
| C241  | DY242123               | 36048490 | Down        | NM_122585                   | WD-40 repeat family protein                                        | 1.00 E-67       | AT5G27030 | NM_187885           | putative CTV.2                             | 2.00 E-66       |  |
| C242  | DY242134               | 36048501 | Down        | ABC25617                    | GAGA-binding transcriptional activator                             | 6.00 E-30       | AT1G14685 | AY569035            | barley B recombinant like-protein B        | 2.00 E-27       |  |
| C244  | DY242071               | 36048438 | Down        | NM_180473                   | unknown protein                                                    | 1.00 E-05       | AT5G10710 | XM_471554           | OSJNBa0019J05.15                           | 7.00 E-08       |  |
| C257  | DY242092               | 36048459 | Up          | NM_126891                   | Unknown protein                                                    | 2.00 E-25       | AT2G12400 | AP005295            | unknown protein [ <i>Oryza sativa</i> ]    | 5.00 E-25       |  |
| C258  | DY242102               | 36048469 | Up          | Q9FYG2                      | ethylene-induced calmodulin-binding protein 4                      | 4.00 E-31       | At1g67310 | XM_472287           | OSJNBa0053B21.7                            | 7.00 E-21       |  |
| C261  | DY242124               | 36048491 | Down        | NM_111041                   | ankyrin repeat family protein                                      | 6.00 E-31       | AT3G01750 | XM_466587           | ankyrin repeat-like protein                | 5.00 E-30       |  |
| C263  | DY242135               | 36048502 | Up          | NM_127713                   | vacuolar proton ATPase, putative                                   | 6.00 E-04       | AT2G21410 | NM_190469           | putative vacuolar proton-ATPase subunit 1  | 0.00 1          |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                   |           |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                                         |           |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                          | e-valuate | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                                | e-valuate |
| C265  | DY242072               | 36048439 | Up          | NM_117821                   | Rab2-like GTP-binding protein (RAB2)              | 5.00 E-19 | AT4G17170 | XM_466431           | putative GTP-binding protein yptm3                                      | 1.00 E-17 |
| C266  | DY242082               | 36048449 | Up          | NM_121774                   | ATP binding / transmembrane receptor              | 8.00 E-15 | AT5G17680 |                     |                                                                         |           |
| C267  | DY242093               | 36048460 | Down        | AAN72057                    | putative malate oxidoreductase                    | 8.00 E-47 | AT4g00570 | AAG13628            | putative mitochondrial NAD <sup>+</sup> -dependent malic enzyme protein | 2.00 E-46 |
| C268  | DY242103               | 36048470 | Down        | NM_115396                   | ubiquitin-conjugating enzyme 14 (UBC14)           | 1.7       | AT3G55380 |                     |                                                                         |           |
| C269  | DY242115               | 36048482 | Up          | NC_002693                   | NADH dehydrogenase subunit 7                      | 7.00 E-37 | AtCg01110 | NM_195998           | putative NADH dehydrogenase 49kDa protein                               | 5.00 E-31 |
| C270  | DY242125               | 36048492 | Down        | ABG48453                    | cyclin T1 - auxin response protein                | 0.004     | At1g17345 |                     |                                                                         |           |
| C273  | DY242073               | 36048440 | Up          | NM_103025                   | Unknown protein                                   | 2.00 E-08 | AT1G32920 |                     |                                                                         |           |
| C274  | DY242083               | 36048450 | Down        | NM_111596                   | putative glucan synthase                          | 2.00 E-35 | AT3G07160 | NM_187562           | Putative callose synthase                                               | 2.00 E-34 |
| C279  | DY242126               | 36048493 | Down        | NM_101547                   | merozoite surface protein-related                 | 3.00 E-18 | AT1G16860 | XM_507171           | unknown protein                                                         | 9.00 E-16 |
| C281  | DY242148               | 36048515 | Down        | NM_121101                   | elongation factor 1-alpha, putative / EF-1-alpha, | 3.00 E-21 | AT5G10630 | XM_549925           | putative translation elongation factor eEF-1                            | 7.00 E-17 |
| C282  | DY242149               | 36048516 | Up          | AK220657                    | hypothetical protein                              | 1.00 E-39 |           | XM_478013           | ubiquitin-related modifier-1                                            | 9.00 E-30 |
| C283  | DY242155               | 36048522 | Up          | NM_124422                   | calcineurin-like phosphoesterase family protein   | 5.00 E-26 | AT5G50400 | XM_483478           | putative diphosphonucleotide phosphatase                                | 1.00 E-26 |
|       |                        |          |             |                             |                                                   |           |           |                     |                                                                         |           |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                    |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                               |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                           | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                      | e-<br>valu<br>e |  |
| C285  | DY242160               | 36048527 | Up          | NM_104028                   | ABC transporter family protein                                     | 1.00<br>E-06    | AT1G51500 | XM_476198           | putative ATP-dependent transmembrane transporter              | 1.2             |  |
| C286  | DY242165               | 36048532 | Up          | NM_119888                   | leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein | 2.00<br>E-15    | AT4G37250 | AP003573            | putative receptor-like protein kinase                         | 5.00<br>E-10    |  |
| C288  | DY242175               | 36048542 | Up          | NM_118802                   | pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein                  | 0.08<br>5       | AT4G26680 | XM_473218           | OSJNBa0019D11.15                                              | 4.00<br>E-06    |  |
| C291  | DY242186               | 36048553 | Down        | NM_112679                   | C2 domain-containing protein                                       | 3.00<br>E-28    | AT3G17980 | XM_465295           | C2 domain-containing protein-like                             | 8.00<br>E-21    |  |
| C296  | DY242166               | 36048533 | Up          | NM_104028                   | ABC transporter family protein                                     | 4.00<br>E-21    | AT1G51500 | XM_476198           | putative ATP-dependent transmembrane transporter              | 1.00<br>E-15    |  |
| C298  | DY242176               | 36048543 | Down        | NM_129420                   | expressed protein                                                  | 2.00<br>E-25    | AT2G38630 | NM_191089           | B1148D12.19                                                   | 4.00<br>E-24    |  |
| C299  | DY242181               | 36048548 | Down        | NM_115712                   | serine/threonine protein phosphatase PP2A-4 catalytic subunit      | 5.00<br>E-80    | AT3G58500 | XM_470009           | serine/threonine protein phosphatase PP2A-2 catalytic subunit | 8.00<br>E-76    |  |
| C300  | DY242187               | 36048554 | Down        | NM_118234                   | ribophorin II (RPN2) family protein                                | 3.00<br>E-15    | AT4G21150 | NM_189888           | putative ribophorin II precursor                              | 3.00<br>E-18    |  |
| C302  | DY242157               | 36048524 | Down        | NM_127697                   | mannose 6-phosphate reductase (NADPH-dependent),                   | 6.00<br>E-43    | AT2G21250 | XM_463936           | putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase [Oryza | 3.00<br>E-43    |  |
| C303  | DY242162               | 36048529 | Down        | NM_129179                   | auxin-responsive family protein                                    | 1.00<br>E-23    | AT2G36210 | AP005833            | auxin-induced protein-like                                    | 6.00<br>E-14    |  |
| C304  | DY242167               | 36048534 | Up          | NM_120605                   | expressed protein                                                  | 3.00<br>E-29    | AT5G05230 | XM_470094           | hypothetical protein                                          | 2.00<br>E-30    |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                   |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                        |                 |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|----------------------------------------|-----------------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                          | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                               | e-<br>valu<br>e |
| C305  | DY242171               | 36048538 | Up          |                             |                                                   |                 |           |                     |                                        |                 |
| P105  | DY241918               | 36048285 | Up          | AF311221                    | C2H2 zinc-finger protein SERRATE                  | 3.00 E-03       | AT2G27100 | XM_483342           | putative C2H2 zinc-finger protein      | 0.003           |
| P106  | DY241929               | 36048296 | Down        | AC084414                    | probable nuM1 protein                             | 0.027           | AT1G48920 | AP005441            | putative nucleolin                     | 4.00 E-03       |
| P107  | DY241939               | 36048306 | Down        | AAG51782                    | myosin-like protein                               | 3.00 E-12       | AT1G47900 | NM_194978           | putative myosin-like protein           | 6.00 E-08       |
| P108  | DY241950               | 36048317 | Down        | AA57618                     | RING finger family protein                        | 2.00 E-27       | AT5G62910 | BX842605            | B1358B12.22 [ <i>Oryza sativa</i> ]    | 4.00 E-18       |
| P109  | DY241961               | 36048328 | Down        | NM_103942                   | scarecrow-like protein                            | 0.012           | AT1G50600 | AE017084            | Putative SCARECROW gene regulator-like | 0.028           |
| P111  | DY241970               | 36048337 | Up          | NM_119801                   | ROT3 (ROTUNDIFOLIA 3)                             | 2.00 E-18       | AT4G36380 | NM_188250           | cytochrome P450-like protein           | 9.00 E-14       |
| P112  | DY241980               | 36048347 | Down        | NM_121289                   | 2-oxoglutarate/malate translocator precursor-like | 8.00 E-23       | AT5G12860 | XM_483000           | putative glutamate/malate translocator | 3.00 E-08       |
| P114  | DY241919               | 36048286 | Down        | AP001299                    | unnamed protein product                           | 0.004           | AT3G15150 |                     |                                        |                 |
| P125  | DY242006               | 36048373 | Up          | AAM20503                    | clathrin adaptor medium chain protein MU1B        | 1.00 E-11       | AT1G60780 | AAU43995            | putative clathrin-associated protein   | 1.00 E-11       |
| P126  | DY242015               | 36048382 | Down        | NM_129823                   | F-box family protein (ORE9)                       | 1.00 E-54       | AT2G42620 | AP006533            | F-box protein ORE9-like                | 3.00 E-41       |
| P129  | DY242024               | 36048391 | Up          | NP_192765                   | putative wound-induced protein                    | 4.00 E-11       | At4g10270 |                     |                                        |                 |
| P130  | DY242034               | 36048401 | Up          | NP_192765                   | putative wound-induced protein                    | 3.00 E-14       | At4g10270 |                     |                                        |                 |
| P132  | DY242051               | 36048418 | Down        | NP_192765                   | putative wound-induced protein                    | 4.00 E-12       | At4g10270 |                     |                                        |                 |
| P135  | DY242007               | 36048374 | Up          | NM_179369                   | Auxin efflux carrier component 7 (AtPIN7)         | 4.00 E-34       | AT1G23080 | NM_192288           | putative efflux carrier, pin3          | 1.00 E-17       |

|       |                        |          |             | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                       |           |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                |           |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|------------------------------------------------|-----------|--|
| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | Numero Annotazione          | Funzione                                                              | e-valuate | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                       | e-valuate |  |
| P144  | DY242043               | 36048410 | Down        | NM_180158                   | vacuolar ATP synthase subunit G 1 (VATG1) / V-ATPase G subunit 1      | 2.00 E-27 | AT3G01390 | XM_473769           | OSJNBa0083N12.23                               | 2.00 E-27 |  |
| P147  | DY242059               | 36048426 | Down        | NM_179944                   | pathogen-responsive DNA-binding protein-related                       | 4.00 E-04 | At2g37025 | XM_468067           | MYB transcription factor-like                  | 0.035     |  |
| P149  | DY241998               | 36048365 | Up          | NM_102057                   | bZIP family transcription factor (TGA3)                               | 3.00 E-72 | AT1G22070 | XM_474046           | OSJNBb0034I13.13 [Oryza sativa]                | 6.00 E-54 |  |
| P151  | DY242008               | 36048375 | Up          | NM_114354                   | ATP binding / kinase/ protein kinase                                  | 5.00 E-15 | AT3G44850 | XM_493799           | SRPK4                                          | 4.00 E-10 |  |
| P154  | DY242025               | 36048392 | Up          | NM_180158                   | vacuolar ATP synthase subunit G 1 (VATG1) / V-ATPase G subunit 1      | 2.00 E-27 | AT3G01390 | XM_473769           | OSJNBa0083N12.23                               | 2.00 E-27 |  |
| P159  | DY242052               | 36048419 | Down        | NM_117892                   | N-acetylornithine deacetylase-like protein                            | 6.00 E-61 | AT4G17830 | XM_467237           | putative silverleaf whitefly-induced protein 1 | 2.00 E-55 |  |
| P160  | DY242060               | 36048427 | Down        | NM_113685                   | chlorophyll A-B binding protein (LHCB2:4)                             | 9.00 E-22 | AT3G27690 | AC135564            | chlorophyll a/b binding protein                | 1.00 E-21 |  |
| P161  | DY241999               | 36048366 | Down        | NM_119448                   | Vacuolar processing enzyme, gamma-isozyme precursor (Gamma-VPE)       | 4.00 E-52 | AT4G32940 | NM_193501           | asparaginyl endopeptidase                      | 1.00 E-54 |  |
| P166  | DY242016               | 36048383 | Down        | NM_121871                   | isoflavone reductase-related                                          | 6.00 E-42 | AT5G18660 | ABF95932            | isoflavone reductase, putative, expressed      | 3.00 E-39 |  |
| P169  | DY242026               | 36048393 | Up          | NM_114602                   | asparagine synthetase 1 [glutamine-hydrolyzing] / glutamine-dependent | 7.00 E-80 | AT3G47340 |                     |                                                |           |  |
|       |                        |          |             | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                       |           |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                |           |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | Numero Annotazione | Funzione                                                           | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione | Funzione                                                     | e-<br>valu<br>e |
|-------|------------------------|----------|-------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|--------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|
| P171  | DY242036               | 36048403 | Down        | NM_103546          | IAA-amino acid hydrolase 6, putative (ILL6) / IAA-Ala hydrolase,   | 2.00<br>E-42    | AT1G44350 | AP005457           | putative IAA-amino acid hydrolase                            | 5.00<br>E-45    |
| P188  | DY242062               | 36048429 | Down        | NM_123662          | expressed protein                                                  | 2.00<br>E-39    | AT5G42960 | XM_470465          | expressed protein                                            | 3.00<br>E-18    |
| P189  | DY242063               | 36048430 | Down        | NM_117197          | phosphatase-related                                                | 1.00<br>E-28    | AT4G11260 | NM_192876          | Sgt1                                                         | 2.00<br>E-30    |
| P201  | DY242158               | 36048525 | Down        | NM_126017          | ferredoxin--NADP(+) reductase, putative / adrenodoxin reductase,   | 9.00<br>E-49    | AT5G66190 | NM_185345          | putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase                   | 9.00<br>E-46    |
| P203  | DY242168               | 36048535 | Up          | NM_111105          | zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)                         | 5.00<br>E-24    | AT3G02380 | NM_185797          | Hd1                                                          | 9.00<br>E-23    |
| P204  | DY242172               | 36048539 | Up          | NM_118421          | senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1 [Arabidopsis | 0.00<br>4       | AT4G22920 | AY850134           | senescence-inducible chloroplast stay-green protein          | 7.00<br>E-04    |
| P206  | DY242178               | 36048545 | Down        |                    |                                                                    |                 |           |                    |                                                              |                 |
| P207  | DY242183               | 36048550 | Down        | NM_130184          | expressed protein                                                  | 7.00<br>E-67    | AT2G46220 | XM_507080          | PREDICTED OJ1076_H08.5 gene product                          | 5.00<br>E-60    |
| P208  | DY242189               | 36048556 | Up          | NM_120359          | pseudo-response regulator 7 (APRR7)                                | 4.00<br>E-07    | AT5G02810 | AB189041           | Two-component response regulator-like PRR95 (Pseudo-response | 6.00<br>E-06    |
| P209  | DY242153               | 36048520 | Up          | NM_121492          | Potassium transporter 8 (AtPOT8) (AtHAK8)                          | 3.00<br>E-47    | AT5G14880 | XM_506953          | putative potassium transporter HAK2p                         | 6.00<br>E-37    |
| P215  | DY242169               | 36048536 | Down        | NM_127941          | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein                | 1.00<br>E-14    | AT2G23780 | XM_469289          | unknown protein                                              | 1.00<br>E-12    |
| P237  | DY242105               | 36048472 | Down        | NM_112293          | strubbelig receptor family 7                                       | 4.00<br>E-49    | AT3G14350 | NM_196278          | putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase 1  | 6.00<br>E-50    |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                     |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                  |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                            | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                         | e-<br>valu<br>e |  |
| P242  | DY242127               | 36048494 | Down        | NM_101788                   | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein                 | 8.00 E-15       | AT1G19310 | NM_191378           | P0403C05.28 [ <i>Oryza sativa</i> ]              | 1.00 E-07       |  |
| P247  | DY242064               | 36048431 | Down        | NM_126040                   | expressed protein                                                   | 6.00 E-24       | AT5G66420 | AP003528            | putative transcriptional regulator               | 4.00 E-23       |  |
| P302  | DY242085               | 36048452 | Down        | NM_104580                   | shaggy-related protein kinase kappa, putative / ASK-kappa, putative | 1.00 E-55       | AT1G57870 | NM_197404           | putative shaggy-like kinase                      | 1.00 E-55       |  |
| P303  | DY242096               | 36048463 | Down        | NM_128977                   | transducin family protein / WD-40 repeat family protein             | 9.00 E-30       | AT2G34260 | NM_186014           | putative transducin / WD-40 repeat protein       | 4.00 E-25       |  |
| P305  | DY242106               | 36048473 | Up          | AL138648                    | putative protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]                    | 1.00 E-22       | AT3G63210 | XM_469171           | putative senescence-associated protein           | 4.00 E-24       |  |
| P306  | DY242118               | 36048485 | Up          | NM_111142                   | putative aspartyl protease                                          | 2.00 E-26       | AT3G02740 | XM_471937           | OSJNBa0008A08.5                                  | 6.00 E-24       |  |
| P307  | DY242128               | 36048495 | Down        | NC_000932                   | ycf2                                                                | 9.00 E-49       | AtCg00860 |                     |                                                  |                 |  |
| P308  | DY242139               | 36048506 | Down        | NM_113246                   | phosphate transporter, putative (PHO1)                              | 2.00 E-36       | AT3G23430 | XM_468327           | putative phosphate transporter                   | 3.00 E-32       |  |
| P312  | DY242065               | 36048432 | Down        | NM_105841                   | leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein  | 2.00 E-88       | AT1G71830 | XM_480325           | putative somatic embryogenesis receptor kinase 1 | 2.00 E-86       |  |
| P313  | DY242076               | 36048443 | Down        | NM_123938                   | heat shock transcription factor family protein                      | 1.00 E-22       | AT5G45710 | NM_191220           | putative heat shock factor                       | 5.00 E-25       |  |
| P318  | DY242097               | 36048464 | Up          | NM_180522                   | calcium-dependent protein kinase 19 (CDPK19)                        | 7.00 E-54       | AT5G19450 | XM_478752           | putative calcium-dependent protein               | 5.00 E-54       |  |
| P319  | DY242107               | 36048474 | Up          | NM_180522                   | calcium-dependent protein kinase 19 (CDPK19)                        | 7.00 E-54       | AT5G19450 | XM_478752           | putative calcium-dependent protein               | 5.00 E-54       |  |

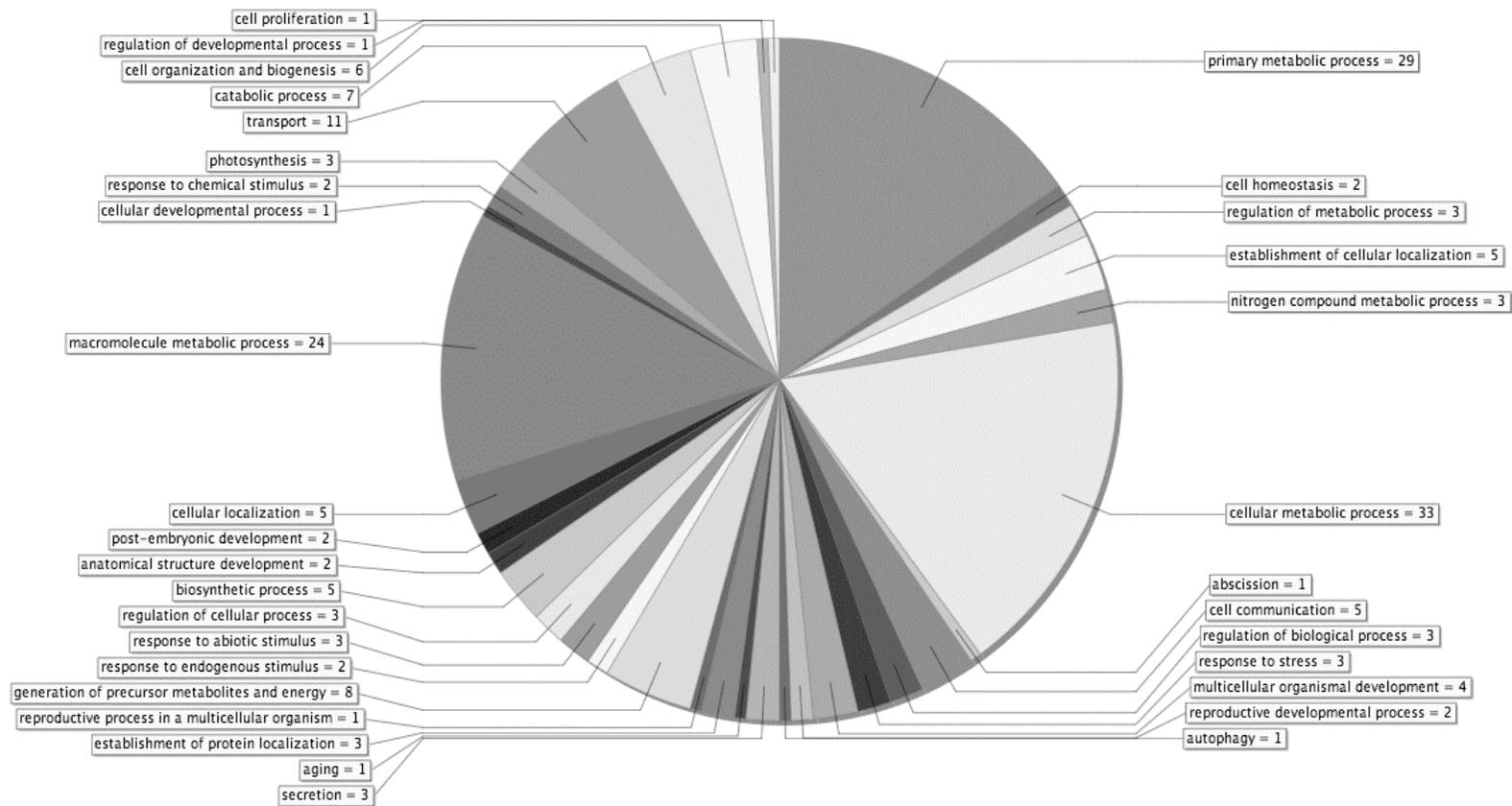
| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                     |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                            |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|------------------------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                            | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                   | e-<br>valu<br>e |  |
| P320  | DY242119               | 36048486 | Down        | NM_120975                   | CD2-binding protein-related                                         | 0.00<br>2       | AT5G09390 | XM_506656           | CD2-binding protein-like                                   | 0.00<br>2       |  |
| P322  | DY242180               | 36048547 | Down        | NM_126147                   | formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing | 8.00<br>E-29    | AT5G67470 | NM_190278           | putative formin-like protein AHF1                          | 2.00<br>E-27    |  |
| P324  | DY242066               | 36048433 | Up          | NM_115412                   | lectin protein kinase, putative                                     | 1.00<br>E-18    | AT3G55550 | XM_476507           | putative receptor kinase Lecrk                             | 5.00<br>E-14    |  |
| P328  | DY242098               | 36048465 | Down        | NM_121496                   | gibberellin-regulated family protein                                | 1.6             | AT5G14920 |                     |                                                            |                 |  |
| P329  | DY242108               | 36048475 | Up          | NM_148557                   | defective chloroplasts and leaves protein-related / DCL             | 1.00<br>E-56    | AT1G45230 | XM_467959           | DCL protein-like                                           | 3.00<br>E-43    |  |
| P332  | DY242130               | 36048497 | Down        | NM_129941                   | mitogen-activated protein kinase, putative / MAPK, putative (MPK6)  | 1.00<br>E-53    | AT2G43790 | AJ535841            | MAP kinase 6                                               | 7.00<br>E-54    |  |
| P333  | DY242141               | 36048508 | Up          | NM_128774                   | haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein                 | 3.00<br>E-43    | AT2G32150 | XM_469419           | putative sugar-starvation induced protein                  | 6.00<br>E-33    |  |
| P335  | DY242067               | 36048434 | Down        | D89631                      | sulfate transporter ATST1                                           | 5.00<br>E-70    | AT3G51895 | AC105729            | Putative sulfate transporter ATST1 [ <i>Oryza sativa</i> ] | 3.00<br>E-66    |  |
| P336  | DY242077               | 36048444 | Up          | AK220657                    | hypothetical protein                                                | 4.00<br>E-40    |           | AB072933            | ubiquitin-related modifier-1                               | 3.00<br>E-32    |  |
| P337  | DY242088               | 36048455 | Down        | AL138648                    | putative protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]                    | 3.00<br>E-23    | AT3G63210 | XM_469171           | putative senescence-associated protein                     | 8.00<br>E-25    |  |
| S001  | DY241975               | 36048342 | Up          | NM_104925                   | Rho GDP-dissociation inhibitor family protein                       | 6.00<br>E-27    | AT1G62450 | AP003543            | putative Rho GDP dissociation inhibitor 2                  | 4.00<br>E-27    |  |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                          |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                             |                 |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                 | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                    | e-<br>valu<br>e |
| S003  | DY241913               | 36048280 | Up          | NM_110994                   | Outer mitochondrial membrane protein porin 1             | 5.00 E-31       | AT3G01280 | NM_192554           | voltage-dependent anion channel                             | 6.00 E-31       |
| S004  | DY241924               | 36048291 | Up          | NM_104412                   | expressed protein                                        | 3.00 E-40       | AT1G55360 | XM_477068           | putative DD1A protein                                       | 3.00 E-39       |
| S005  | DY241934               | 36048301 | Up          | NM_120280                   | putative protein                                         | 1.00 E-17       | AT5G02020 | NM_190608           | P0005H10.22 [ <i>Oryza sativa</i> ]                         | 8.00 E-04       |
| S006  | DY241945               | 36048312 | Up          |                             |                                                          |                 |           |                     |                                                             |                 |
| S007  | DY241956               | 36048323 | Up          | NM_117467                   | hydroxymethyltransferase                                 | 8.00 E-52       | AT4G13930 | XM_463512           | putative serine hydroxymethyltransferase                    | 7.00 E-32       |
| S008  | DY241966               | 36048333 | Up          | NM_104376                   | LOX1; lipoxygenase                                       | 8.00 E-29       | AT1G55020 |                     |                                                             |                 |
| S009  | DY241976               | 36048343 | Down        | NM_111267                   | putative T-complex protein 1, theta subunit; TCP-1-Theta | 2.00 E-34       | AT3G03960 | XM_470005           | putative TCP-1/cpn60 chaperonin family protein              | 3.00 E-37       |
| S012  | DY241925               | 36048292 | Up          | NM_114370                   | serine carboxypeptidase III, putative                    | 2.00 E-29       | AT3G45010 |                     |                                                             |                 |
| S013  | DY241935               | 36048302 | Down        | NM_124878                   | pyruvate decarboxylase                                   | 2.00 E-33       | AT5G54960 | U27350              | pyruvate decarboxylase                                      | 4.00 E-35       |
| S015  | DY241957               | 36048324 | Up          | AAM64605                    | alcohol dehydrogenase                                    | 1.00 E-21       | AT1G32780 | AAP52231            | putative alcohol dehydrogenase                              | 8.00 E-20       |
| S016  | DY241967               | 36048334 | Up          | BAD94954                    | carboxypeptidase precursor-like protein                  | 4.00 E-26       | AT3g45010 | NM_187300           | carboxypeptidase C cbp31                                    | 1.00 E-23       |
| S017  | DY241977               | 36048344 | Up          | NM_125214                   | 26S proteasome AAA-ATPase subunit (RPT3)                 | 9.00 E-56       | AT5G58290 | XM_465282           | putative 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase | 2.00 E-55       |
| S018  | DY241986               | 36048353 | Down        | NM_119448                   | vacuolar processing enzyme gamma / gamma-VPE             | 1.00 E-57       | AT4G32940 | NM_193501           | asparaginyl endopeptidase                                   | 6.00 E-57       |

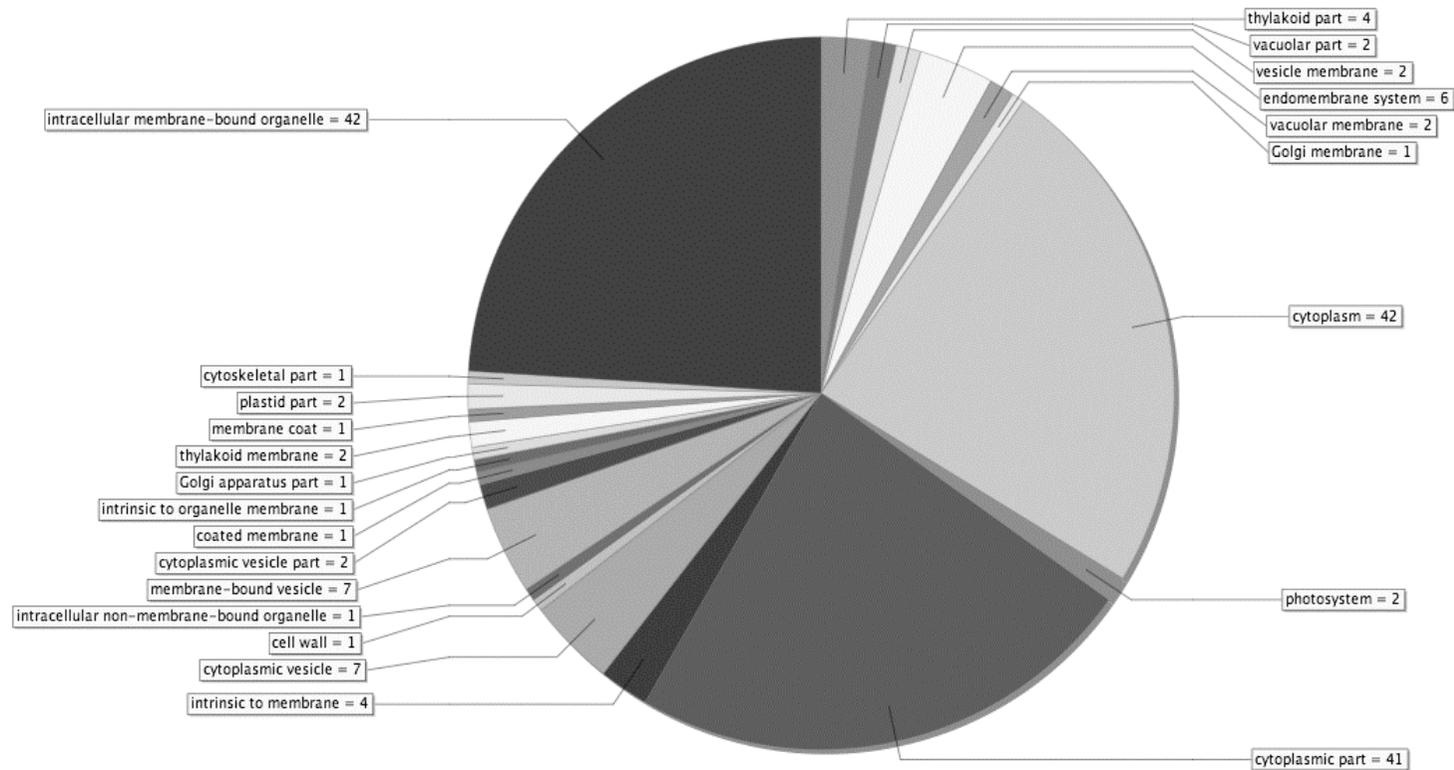
| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                     |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                                                     |                 |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                            | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                                            | e-<br>valu<br>e |
| S019  | DY241915               | 36048282 | Up          | NM_105254                   | tRNA-splicing endonuclease positive effector-related                | 7.00 E-35       | AT1G65810 | AL662987            | OSJNBa0088A01.10                                                    | 1.00 E-31       |
| S020  | DY241926               | 36048293 | Up          | NM_180633                   | Sugar transporter ERD6-like 5                                       | 4.00 E-63       | AT1G54730 | AC007858            | 10A19I.3 [ <i>Oryza sativa</i>                                      | 7.00 E-30       |
| S021  | DY241936               | 36048303 | Up          | NM_113124                   | OTU-like cysteine protease family protein                           | 4.00 E-17       | AT3G22260 | XM_464260           | unknown protein                                                     | 1.00 E-16       |
| S022  | DY241947               | 36048314 | Up          | NM_129214                   | pyruvate kinase, putative                                           | 3.00 E-39       | AT2G36580 | AC120307            | Pyruvate kinase, barrel domain                                      | 2.00 E-38       |
| S023  | DY241958               | 36048325 | Up          | BAF01964                    | hypothetical protein                                                | 9.00 E-42       |           |                     |                                                                     |                 |
| S026  | DY241987               | 36048354 | Up          | NM_125739                   | unknown protein                                                     | 5.00 E-16       | AT5G63440 | XM_477566           | unknown protein                                                     | 1.00 E-17       |
| S027  | DY241916               | 36048283 | Up          | NM_104710                   | splicing factor PWI domain-containing protein / RNA recognition     | 1.00 E-10       | AT1G60200 | XM_482410           | putative RNA-binding region RNP-1 and Splicing factor PWI family    | 4.00 E-06       |
| S028  | DY241927               | 36048294 | Up          | NM_118487                   | glycosyl hydrolase family 9 protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] | 3.00 E-14       | AT4G23560 | XM_482166           | putative cellulase [ <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] | 5.00 E-11       |
| S029  | DY241937               | 36048304 | Up          | AY087416                    | putative aminotransferase                                           | 5.00 E-59       | At1g77670 | AP005393            | putative cysteine conjugate beta-lyase                              | 8.00 E-58       |
| S030  | DY241948               | 36048315 | Up          | NM_105936                   | protein phosphatase 2C P2C-HA / PP2C P2C-HA (P2C-HA)                | 0.015           | AT1G72770 | XM_476022           | putative protein phosphatase 2C ABI2                                | 0.026           |
| S031  | DY241959               | 36048326 | Down        | AY085805                    | putative GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein                   | 6.00 E-28       | AT1G29660 | NM_191210           | putative GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein                   | 5.00 E-30       |
| S032  | DY241968               | 36048335 | Up          | NM_101421                   | ABC transporter family protein                                      | 0.001           | AT1G15520 | XM_482141           | putative PDR-like ABC transporter                                   | 3.00 E-05       |

| Clone | Numero accesso GenBank | dbEST_Id | Regolazione | <i>Arabidopsis thaliana</i> |                                                                   |                 |           | <i>Oryza sativa</i> |                                             |                 |  |
|-------|------------------------|----------|-------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------|-----------------|--|
|       |                        |          |             | Numero Annotazione          | Funzione                                                          | e-<br>valu<br>e | At code   | Numero Annotazione  | Funzione                                    | e-<br>valu<br>e |  |
| S033  | DY241978               | 36048345 | Up          | NM_124129                   | sodium-dicarboxylate cotransporter-like                           | 2.00<br>E-85    | AT5G47560 | XM_483220           | putative sodium-dicarboxylate cotransporter | 9.00<br>E-73    |  |
| S034  | DY241988               | 36048355 | Up          | NM_105397                   | putative glyoxal oxidase (glx1) [Arabidopsis thaliana]            | 1.00<br>E-15    | AT1G67290 | AC144735            | putative glyoxal oxidase                    | 2.00<br>E-12    |  |
| S035  | DY241917               | 36048284 | Up          | NM_112225                   | beta-galactosidase [Arabidopsis thaliana]                         | 1.00<br>E-64    | AT3G13750 | NM_192994           | member protein                              | 7.00<br>E-59    |  |
| S036  | DY241928               | 36048295 | Up          | AL138648                    | putative protein [Arabidopsis thaliana]                           | 3.00<br>E-23    | AT3G63210 | XM_469171           | putative senescence-associated protein      | 9.00<br>E-25    |  |
| S038  | DY241949               | 36048316 | Up          | NM_128319                   | AAA-type ATPase family protein / vacuolar sorting protein-related | 2.00<br>E-42    | AT2G27600 | AF499028            | AAA-ATPase-like protein                     | 3.00<br>E-40    |  |

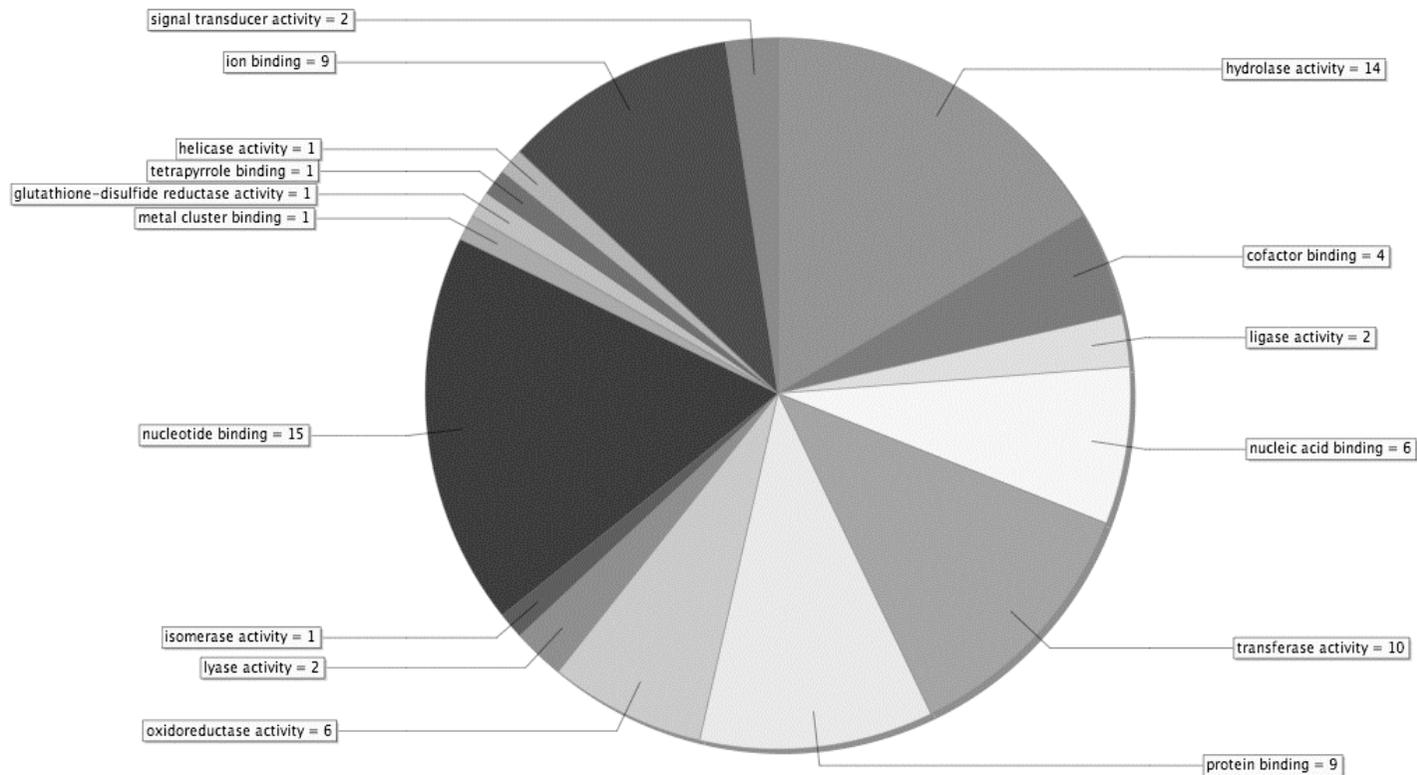




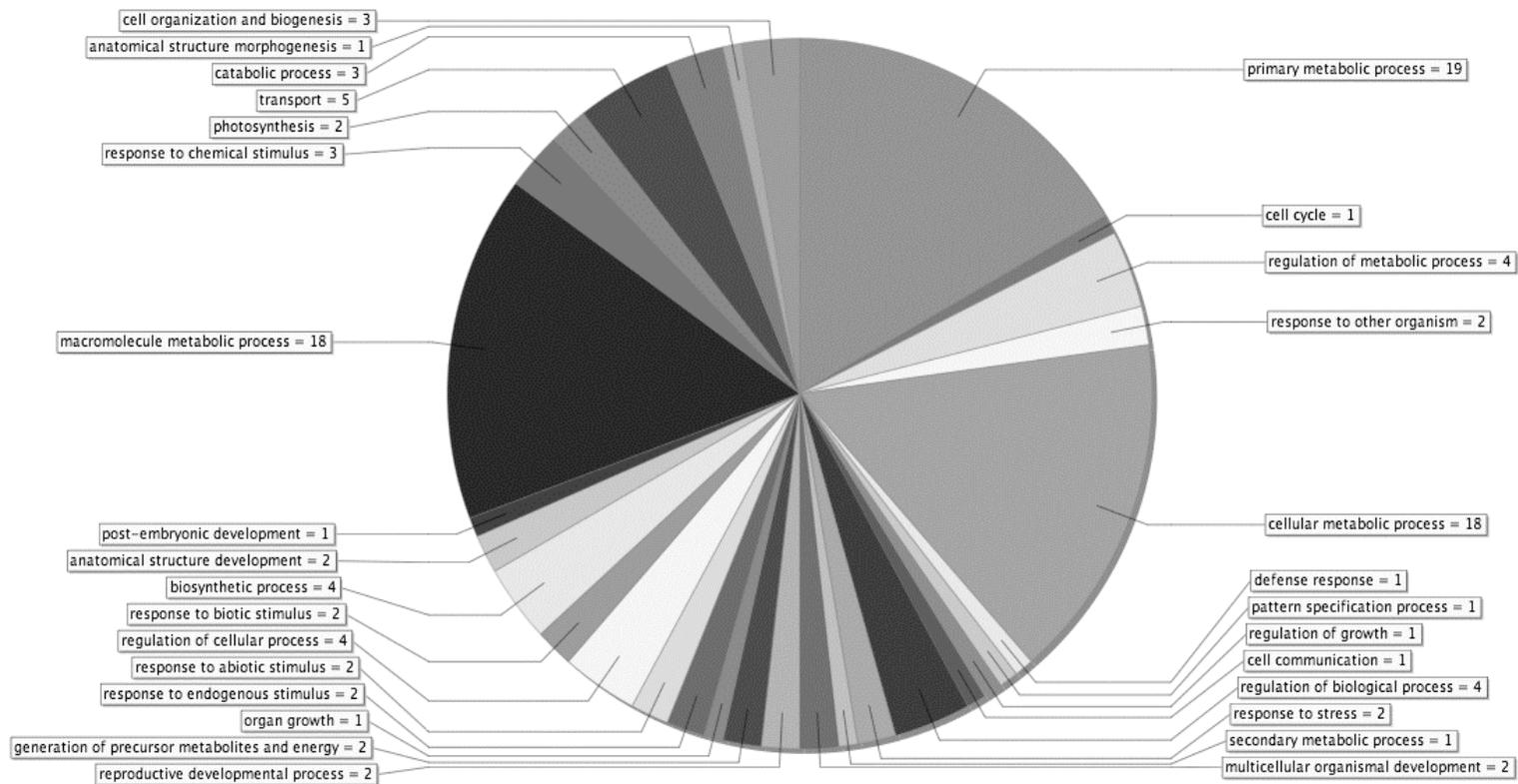
**Allegato B - Figura B.1: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



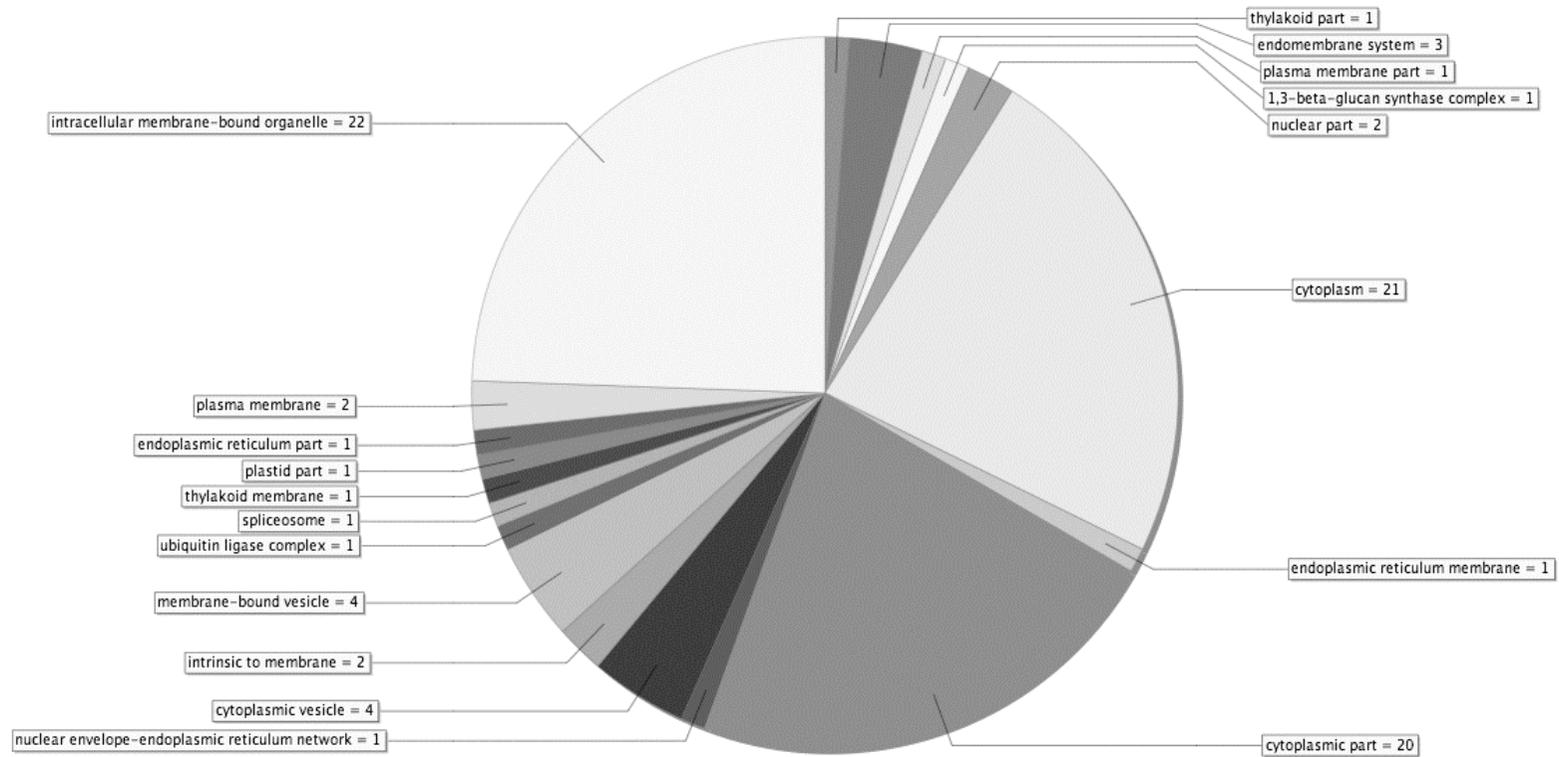
**Allegato B - Figura B.2: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



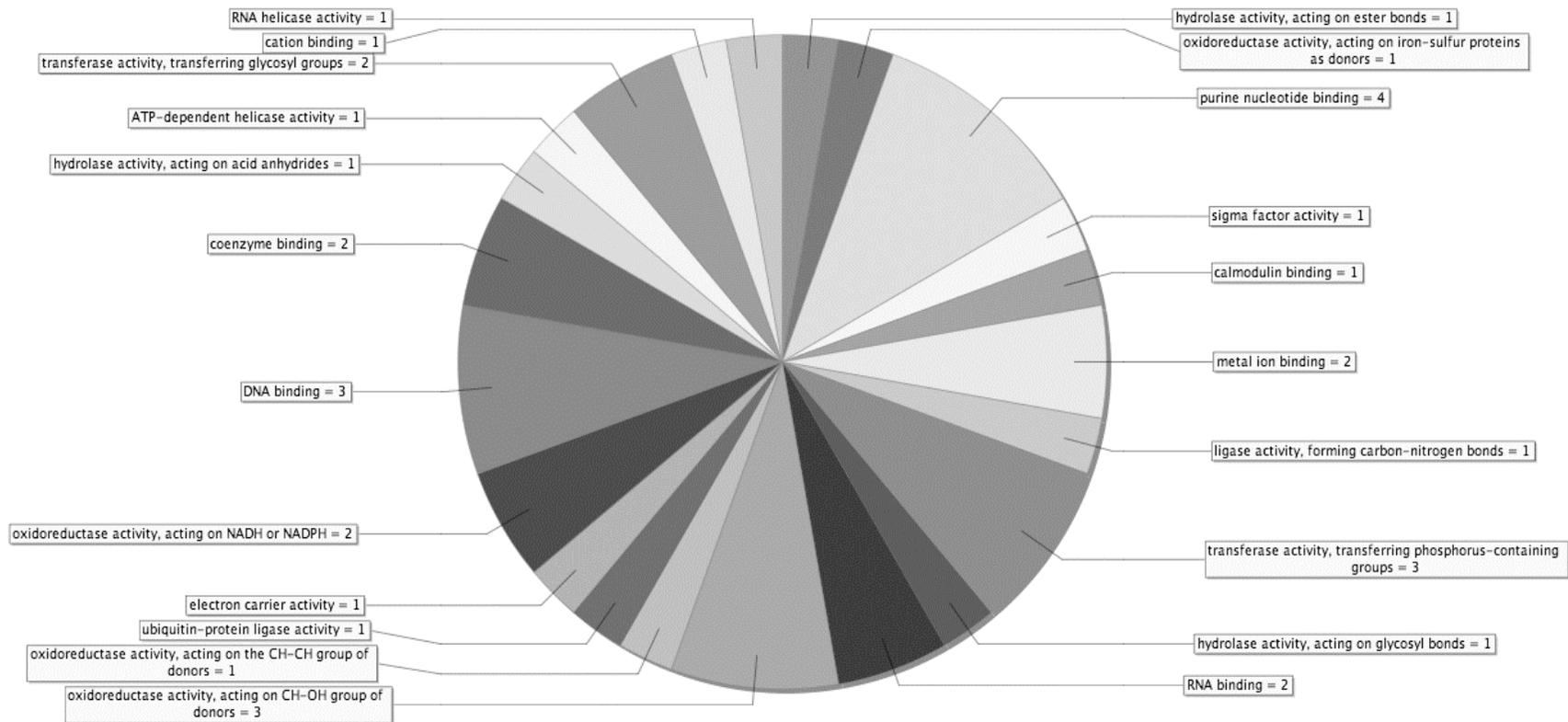
**Allegato B - Figura B.3: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



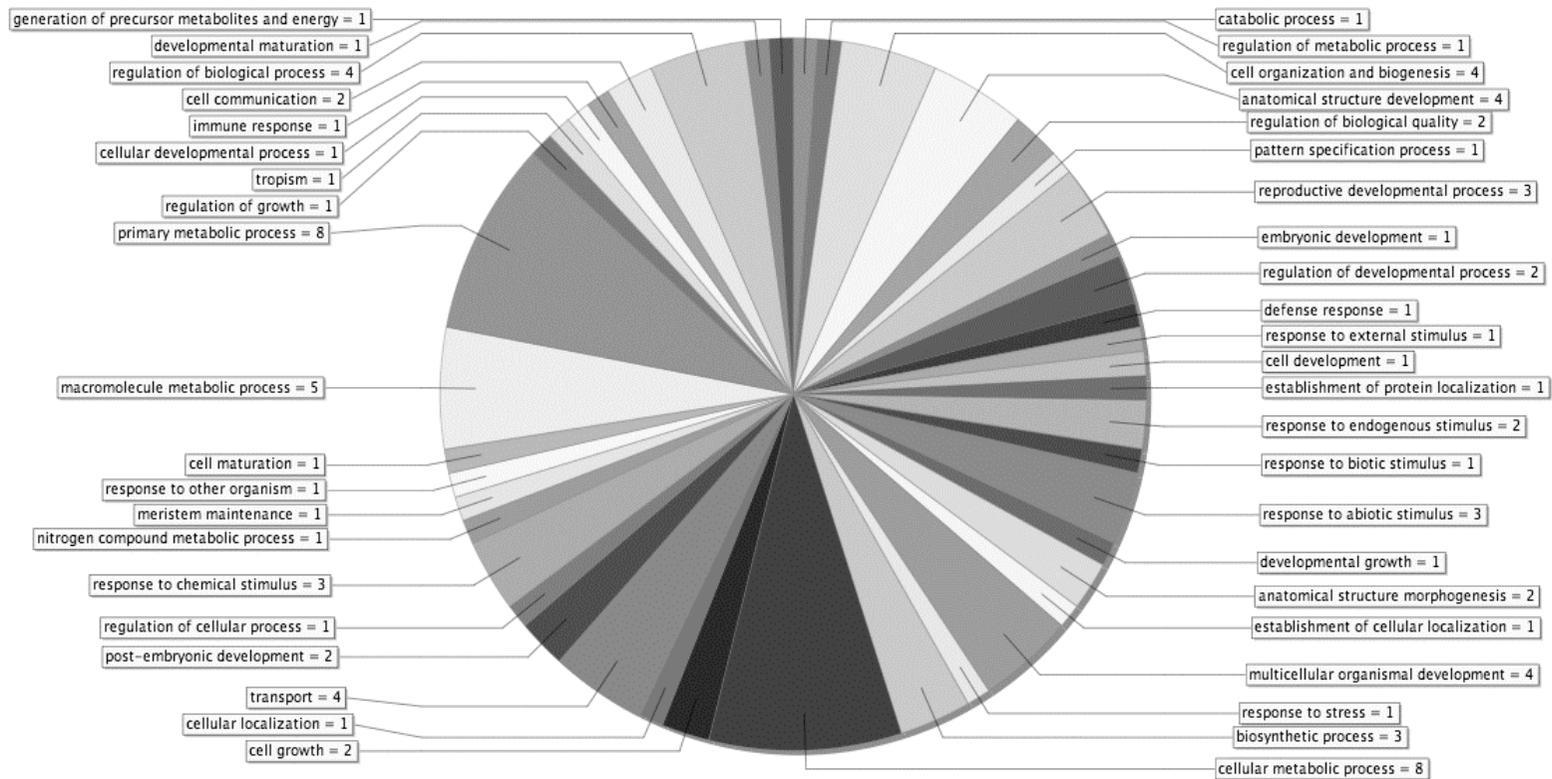
**Allegato B - Figura B.4: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



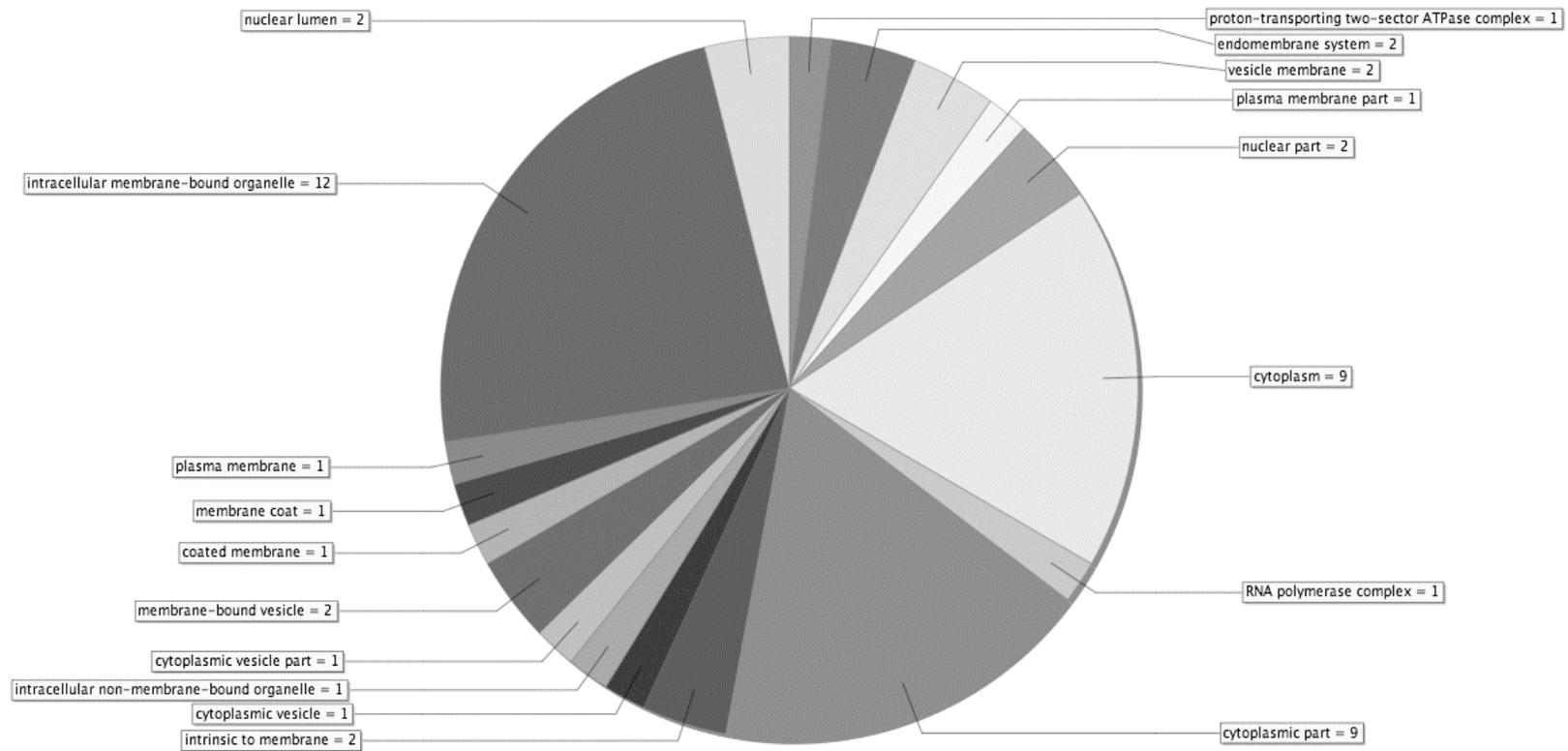
**Allegato B - Figura B.5: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



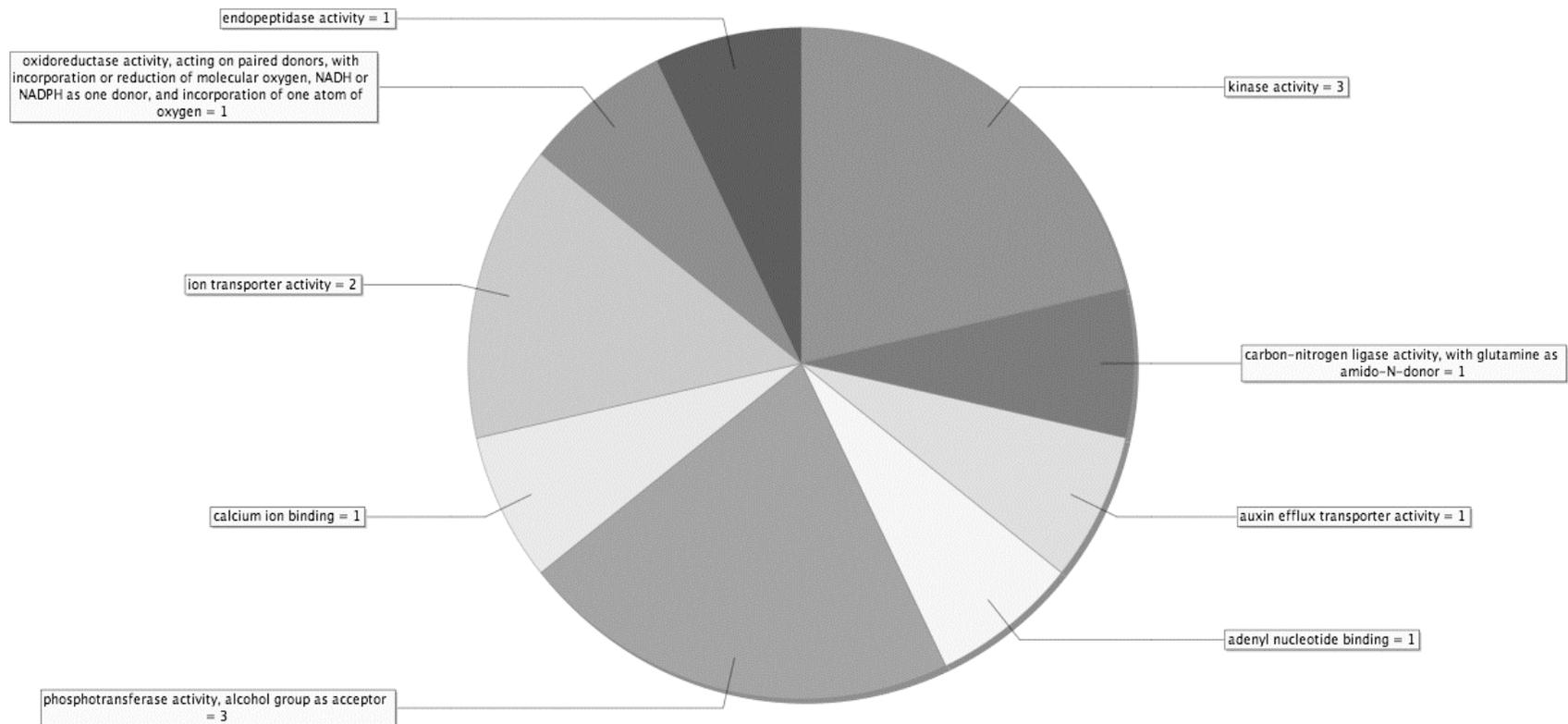
**Allegato B - Figura B.6: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in cortex. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



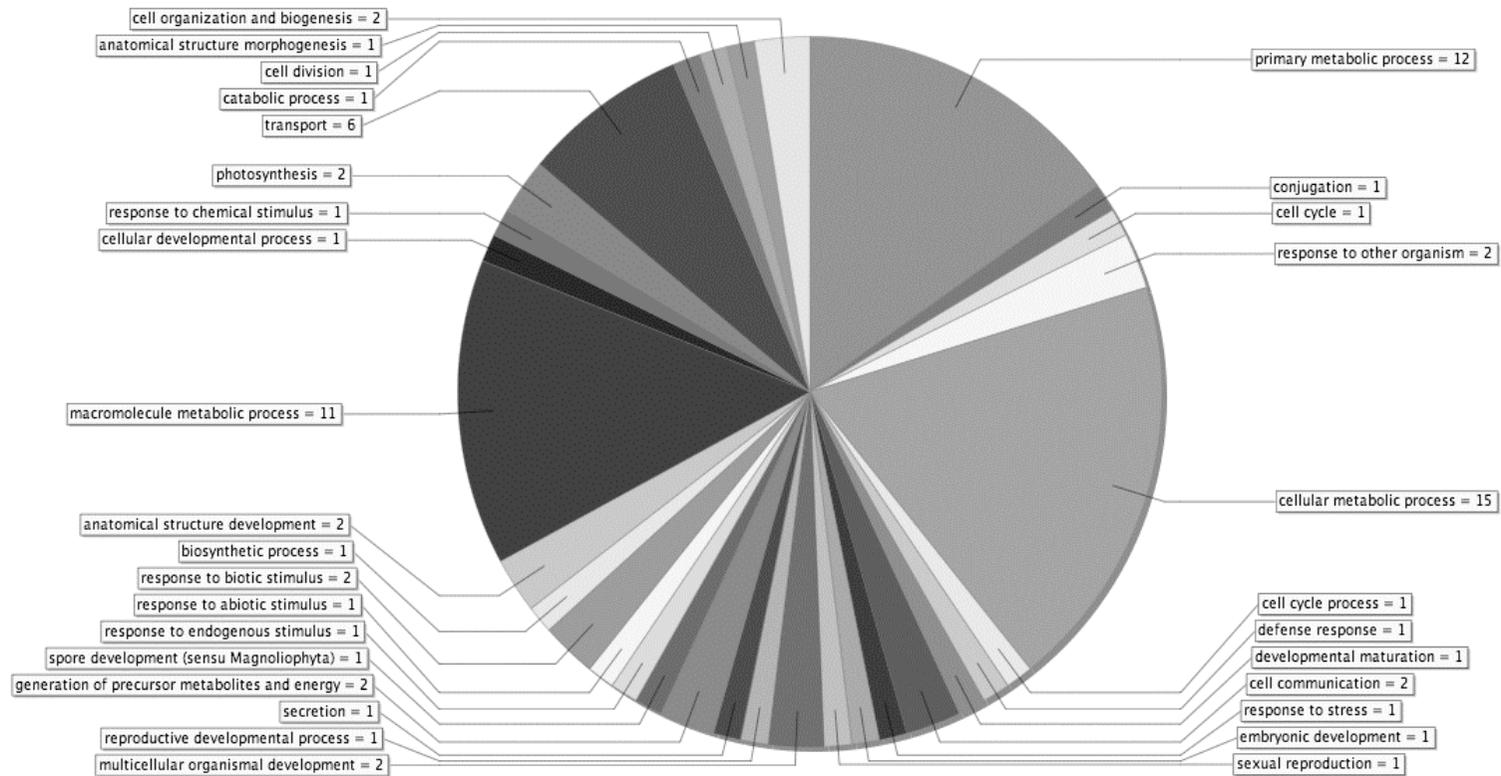
**Allegato B - Figura B.7: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



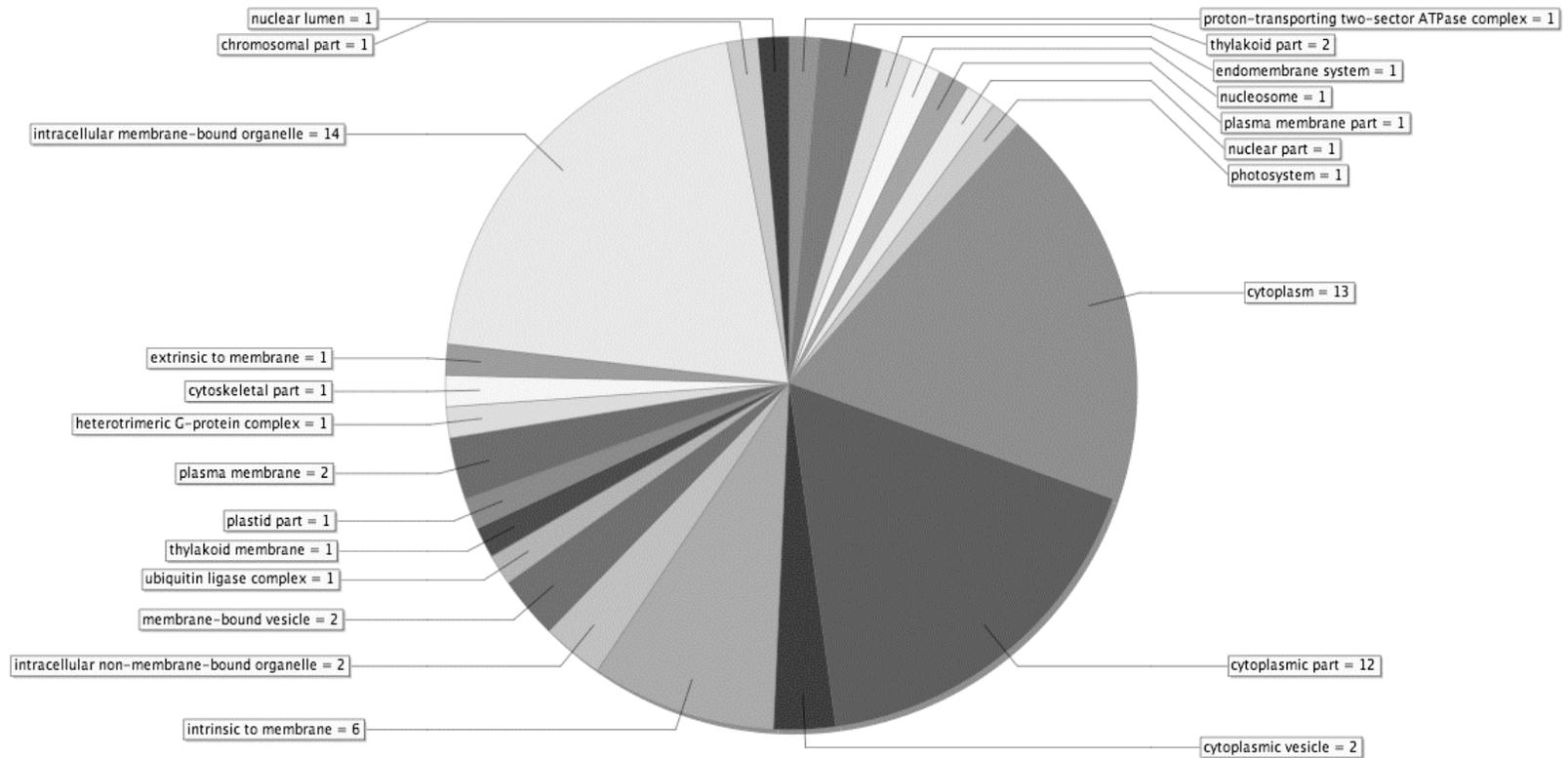
**Allegato B - Figura B.8: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



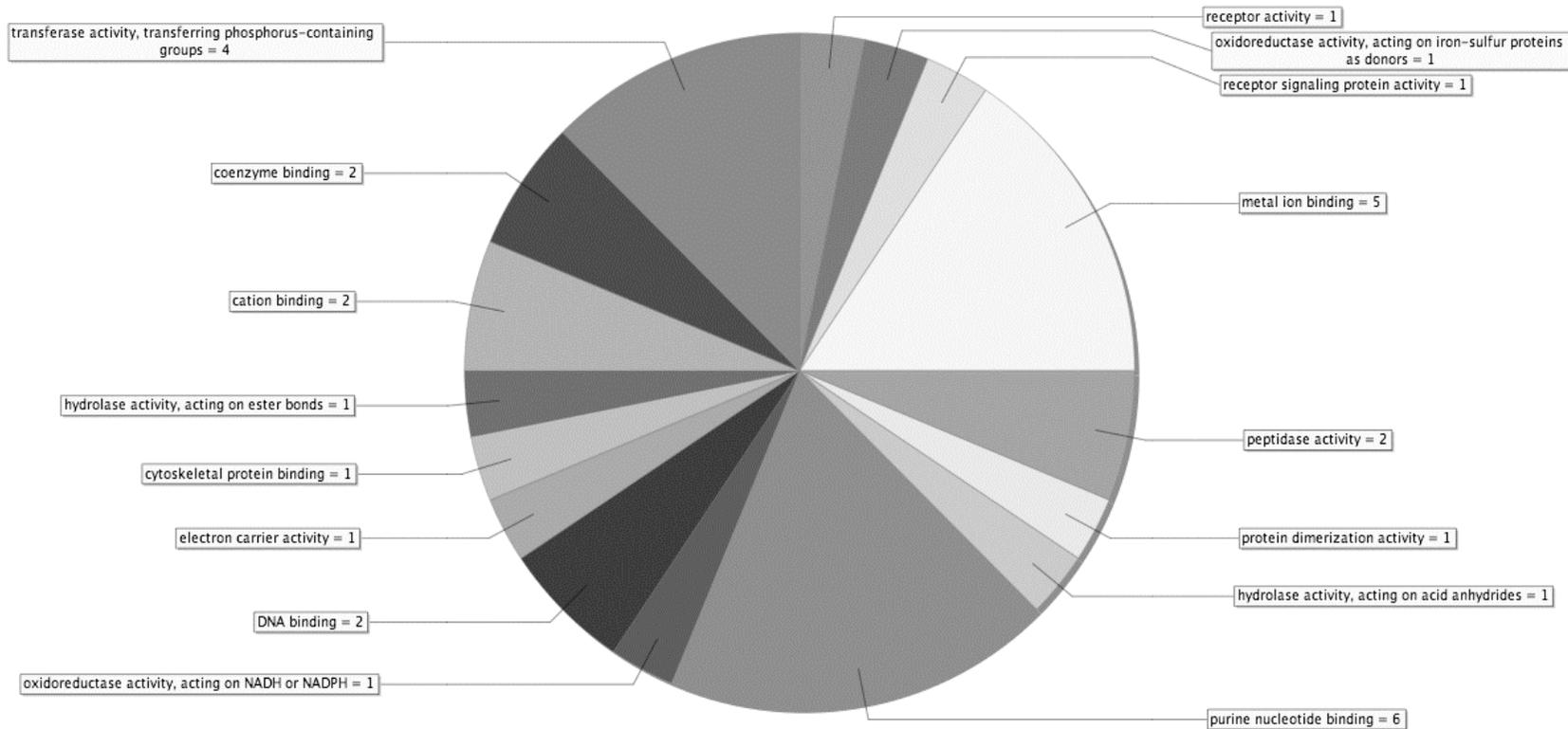
**Allegato B - Figura B.9: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al quinto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



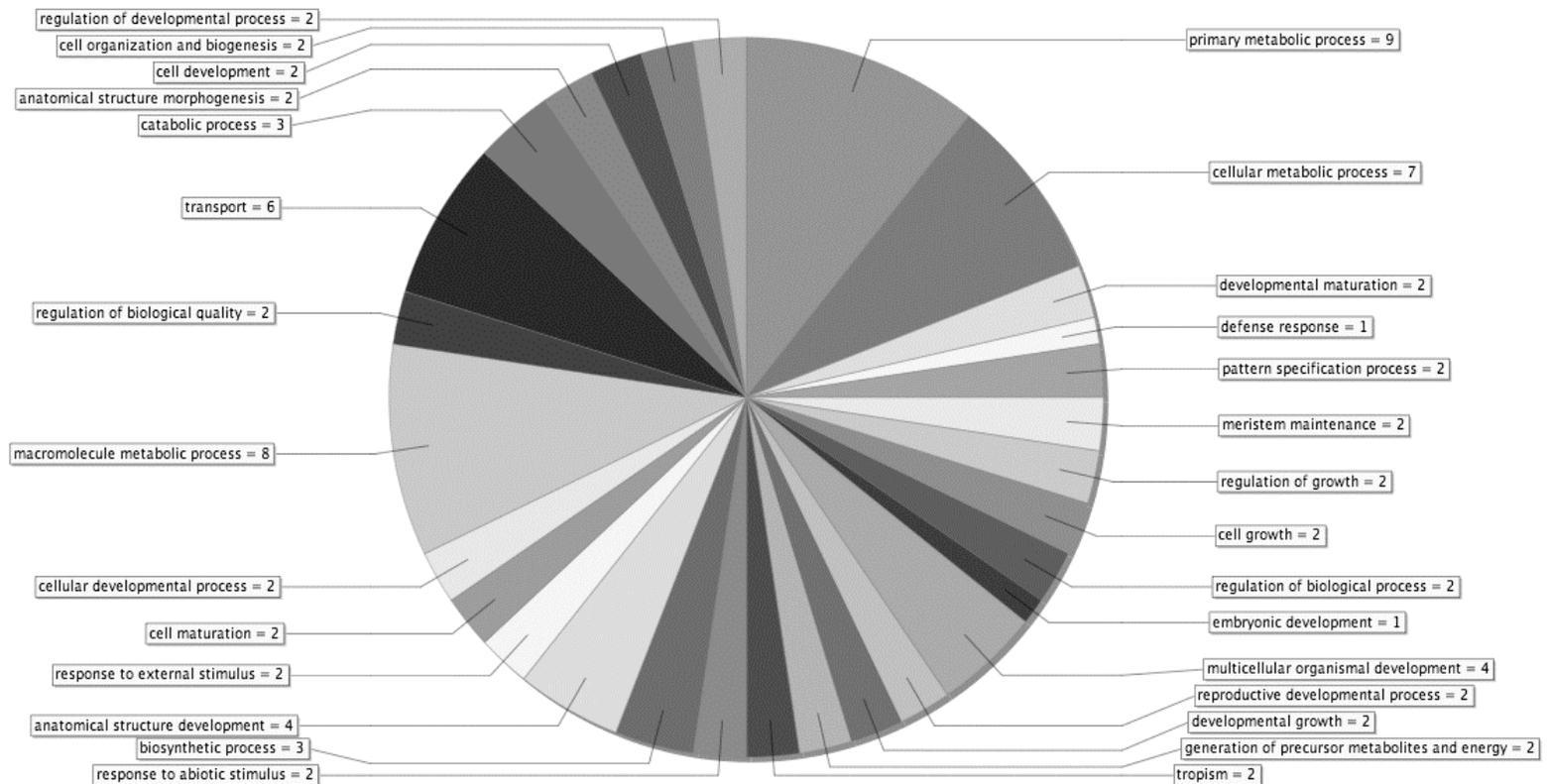
**Allegato B - Figura B.10: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



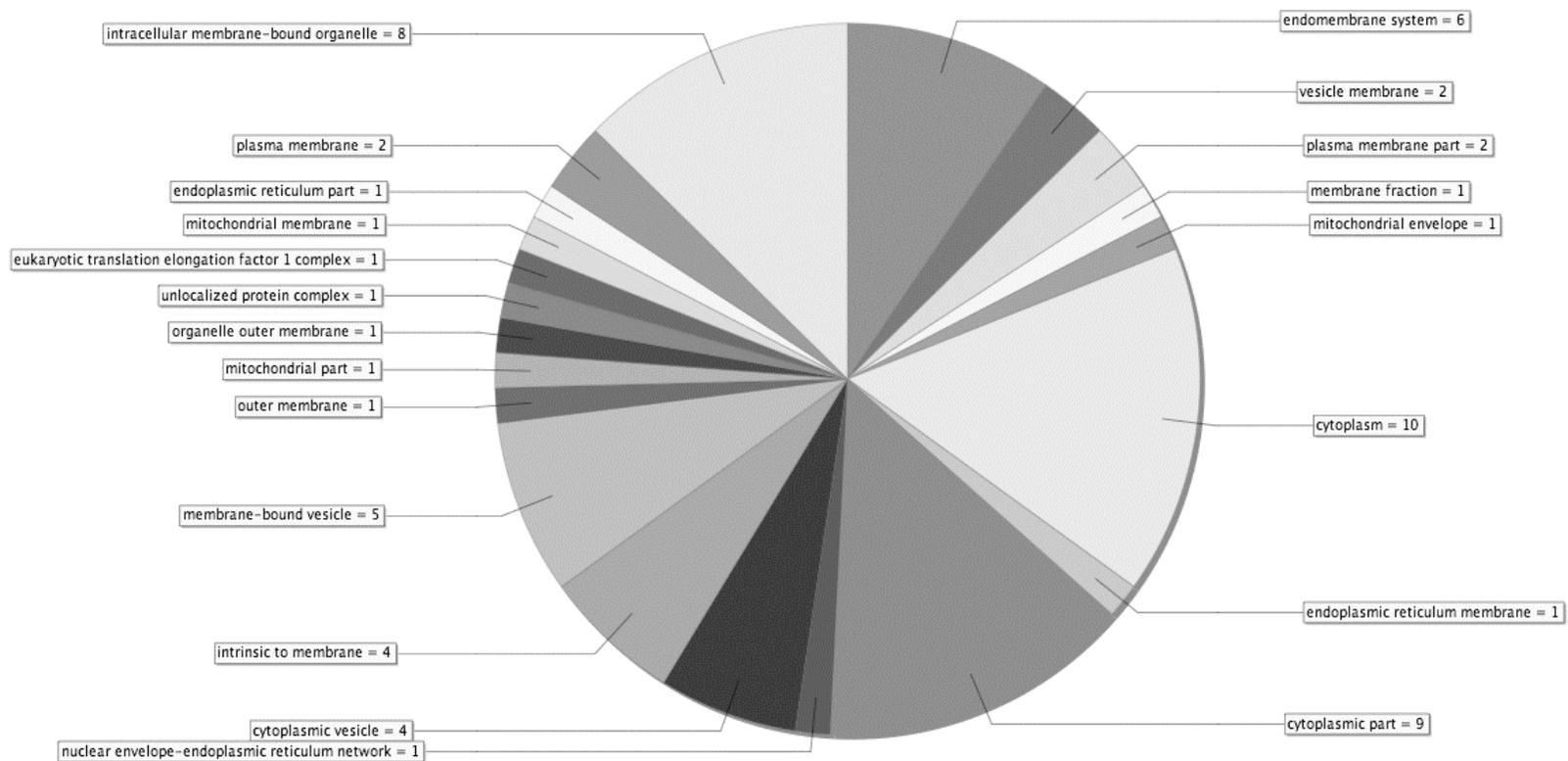
**Allegato B - Figura B.11: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



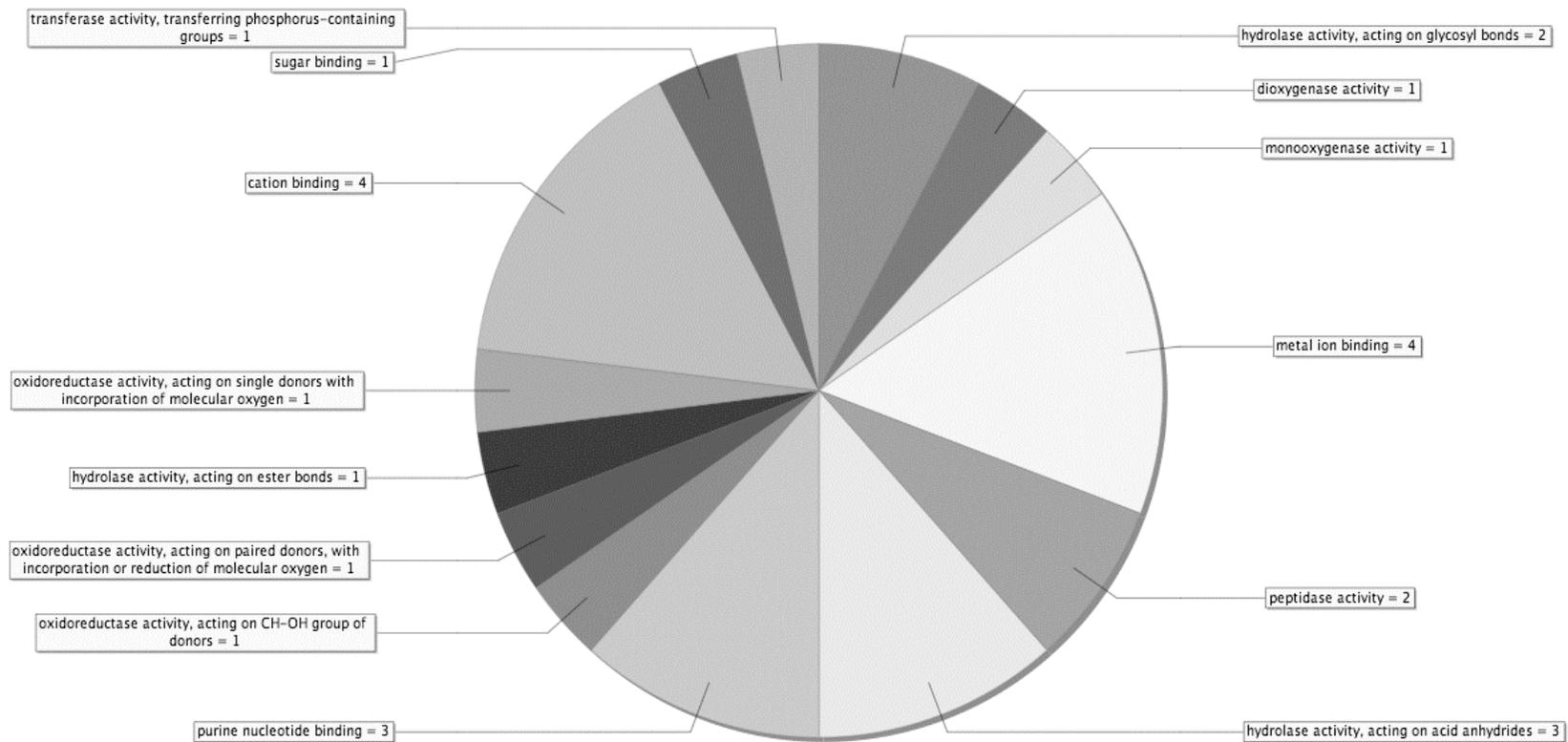
**Allegato B - Figura B.12: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in peduncolo. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



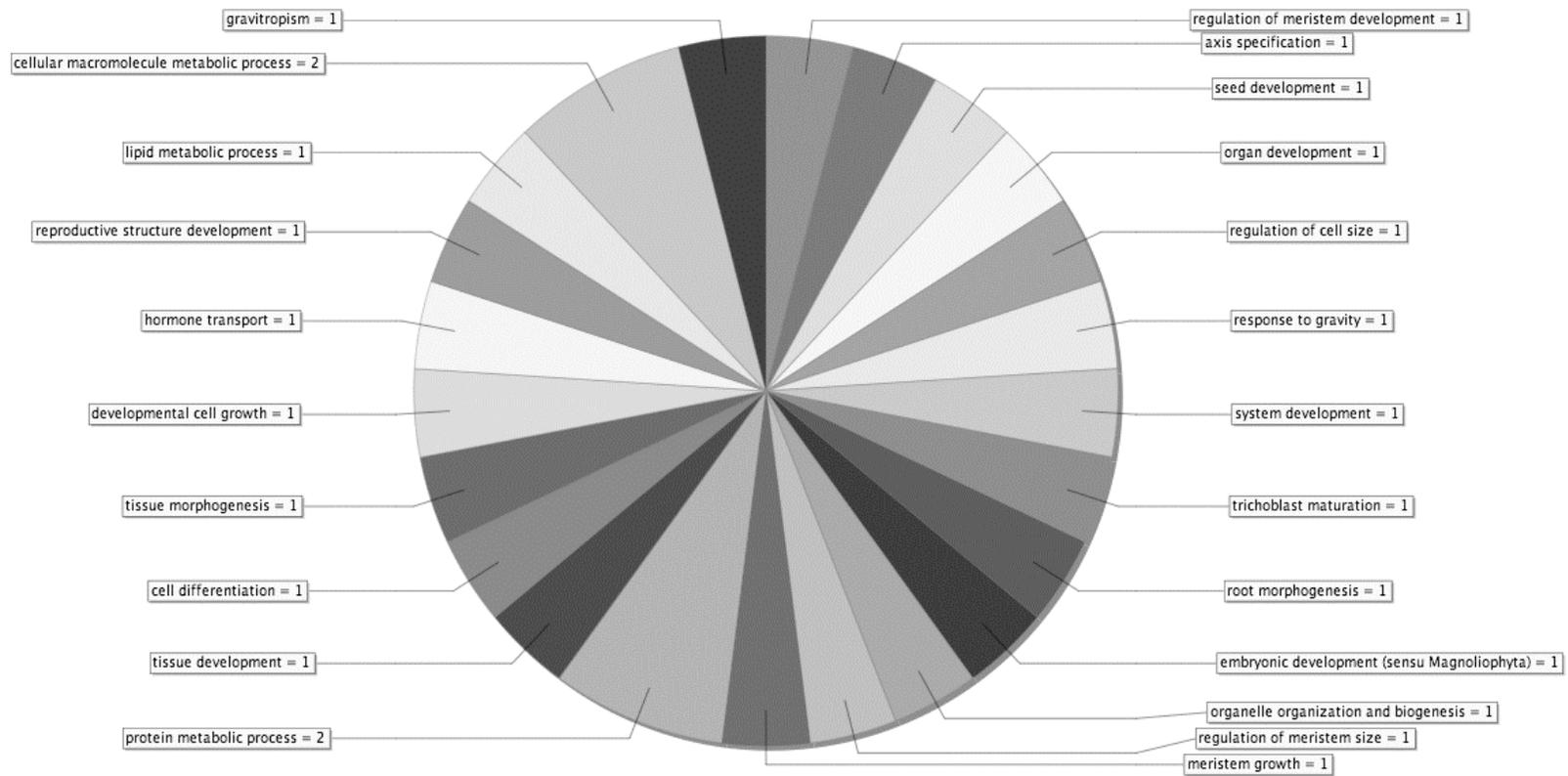
**Allegato B - Figura B.13: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



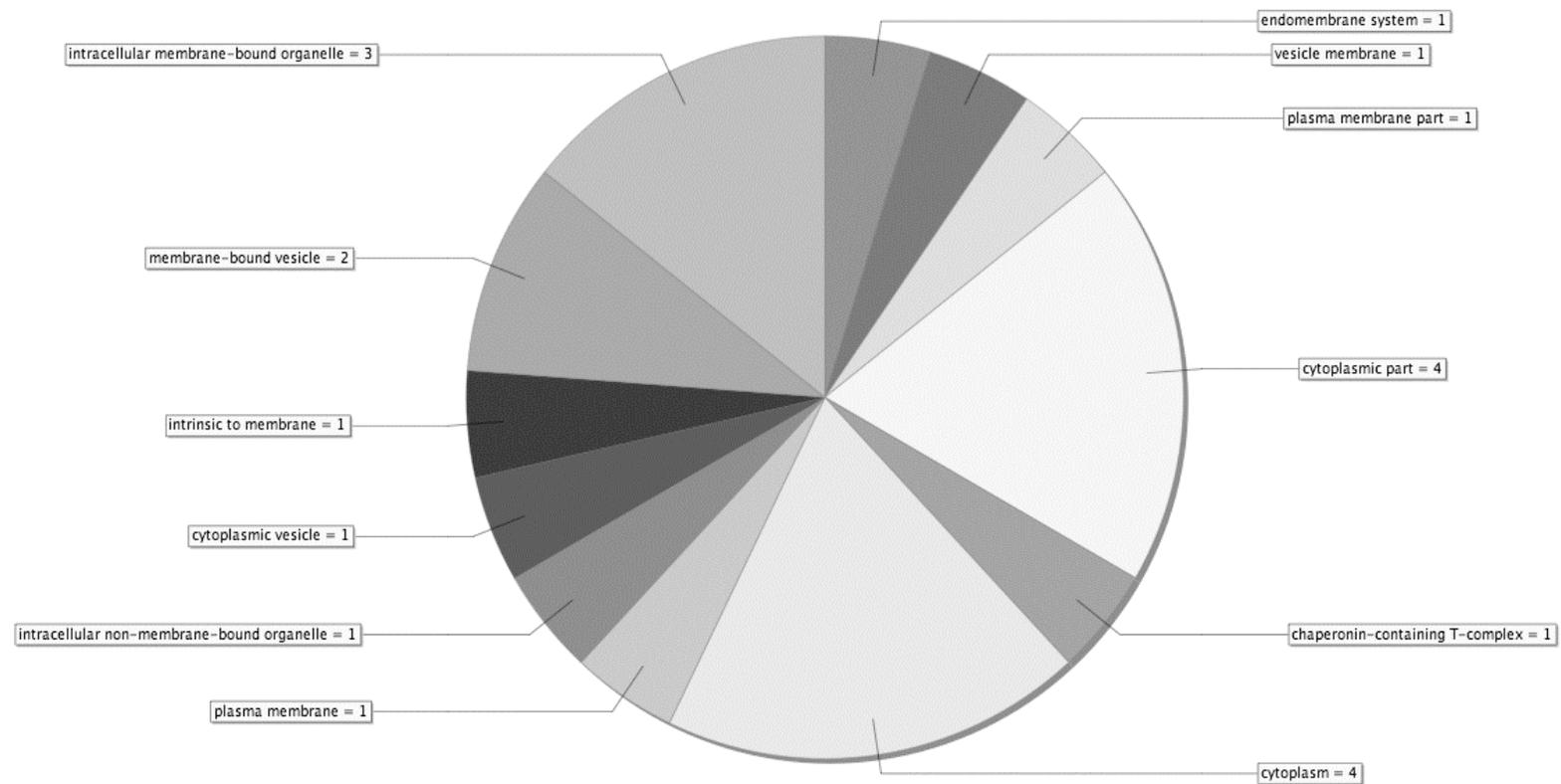
**Allegato B - Figura B.14: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



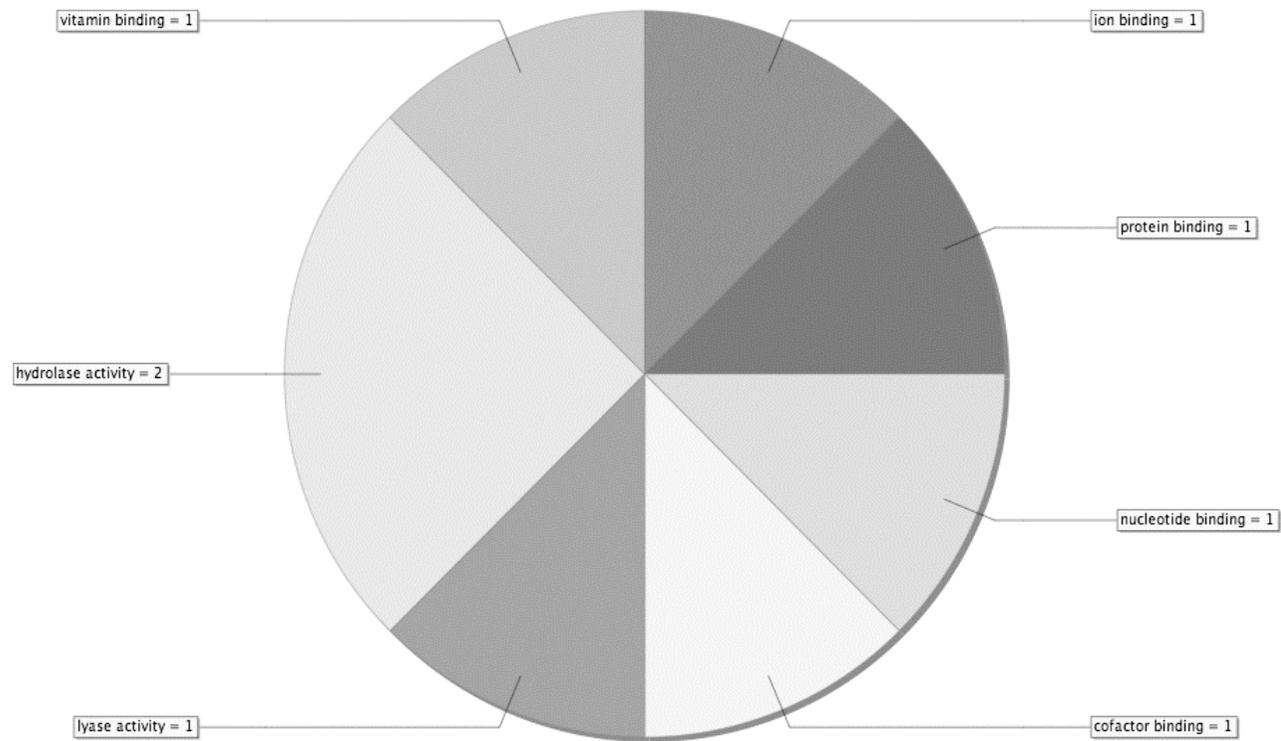
**Allegato B - Figura B.15: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati positivamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



**Allegato B - Figura B.16: Classificazione secondo il criterio "processo biologico", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



**Allegato B - Figura B.17: Classificazione secondo il criterio "componente cellulare", fino al quarto livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**



**Allegato B - Figura B.18: Classificazione secondo il criterio "funzione molecolare", fino al terzo livello della gene ontology, dei contig e singleton regolati negativamente in seme. La classificazione è stata ottenuta con il software Blast2GO.**