

Giornata di studio su:

Impatto della ricerca genetica
e delle tecnologie avanzate
sull'evoluzione dei sistemi agrari

Firenze, 24 aprile 2008

La genomica in frutticoltura: recenti acquisizioni per il miglioramento genetico, la produzione e la qualità del frutto

Le biotecnologie genetiche hanno rivoluzionato l'agricoltura di larga parte del mondo. Per sgombrare il campo da possibili equivoci, occorre distinguere fra biotecnologie molecolari (in particolare la genomica) da quelle che sottendono all'ingegneria genetica; le prime sono state assecondate nell'ultimo decennio da validi progetti sostenuti anche dall'UE, le seconde, invece, frenate o private di fondi; la ricerca, le attività produttive e il Paese hanno perciò sofferto per questa dicotomia. Nello scenario internazionale la genomica italiana si colloca a un buon livello di competitività. Importanti risultati, quali ad esempio il sequenziamento del genoma della vite e quello, quasi ultimato, del melo, sono stati conseguiti in campo arboreo. Le conoscenze disponibili in questi settori potrebbero in breve portare all'introduzione di genotipi e varietà in grado di resistere a malattie e ad avversità ambientali, a una maggiore razionalizzazione dei processi produttivi, al miglioramento della qualità dei prodotti e della sicurezza alimentare. L'individuazione di migliaia di geni, attraverso sequenziamento, clonaggio e mappaggio, apre enormi possibilità di utilizzo in programmi di miglioramento genetico mirati, in tecniche di propagazione e difesa ecocompatibili e biologiche, nel predisporre appropriati metodi di irrigazione e di somministrazione dei nutrienti, nell'ottimizzare la gestione delle risorse energetiche di cui l'agricoltura ha bisogno. La conoscenza della funzione dei singoli geni, le loro interazioni, i meccanismi di regolazione, le proteine da essi codificate e la loro espressione nei "pathway" metabolici della pianta stanno già producendo positive influenze in vari campi, a cominciare dalle innovazioni genetico-varietali dando luogo, nel complesso, a una nuova "biologia dei sistemi". Su questa base si potranno anche ipotizzare imponenti

* *Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna*

aggiornamenti degli interventi agronomici necessari alla coltivazione, anche sul piano della tempestività e modalità di esecuzione. Si modificheranno i protocolli per i disciplinari di produzione sia in funzione delle resistenze agli stress abiotici (es. siccità e salinità) sia di quelle agli stress biotici (patogeni, fitofagi e malattie infettive).

Le applicazioni della genomica in frutticoltura, argomento di questa trattazione, sono pertanto molteplici e vengono qui riassunte in cinque punti, di seguito esaminati singolarmente:

a) *Genotipizzazione*. La caratterizzazione del genotipo è alla base sia della verifica della rispondenza varietale (e quindi della caratterizzazione del germoplasma), sia della individuazione nelle linee ascendenti e discendenti, dei caratteri fenotipici trasmessi. Importante è anche la capacità di discriminare attraverso l'impronta genetica ("fingerprinting") i mutanti nelle varietà policonali, nonché quella di sviluppare la tracciabilità di filiera per risalire all'origine dei prodotti raccolti e di quelli trasformati. Altre applicazioni riguardano l'analisi delle progenie di incroci controllati; del flusso degli alleli relativi ai marcatori associati a caratteri di interesse agrario. Altro esempio è lo studio degli alleli del locus S (incompatibilità gametofitica) nelle specie allogame e in particolare nelle Rosaceae.

b) *Marcatori molecolari funzionali*. Lo sviluppo dei marcatori molecolari viene sempre più orientato sulla base delle sequenze dei geni che determinano e regolano le funzioni delle piante da frutto di interesse agrario. Tale approccio aumenta notevolmente l'efficacia dei marcatori molecolari associati a caratteri qualitativi (monogenici) e quantitativi (poligenici). Facilitata è quindi la localizzazione dei geni nelle mappe genetiche, specie per specie. Vengono in tal modo individuate le regioni genomiche in cui sono posizionati le sequenze geniche, i geni e i QTLs ("Quantitative trait loci") e cioè le regioni che codificano per i caratteri quantitativi. Grande impulso allo sviluppo di marcatori funzionali deriva dal supporto della bioinformatica (banche dati EST – Expressed Sequences Tag, sequenze di genomi, ecc.)

c) *Espressione dei geni e trascrittomica*. La trascrittomica studia, a valle del DNA, l'espressione dei geni attraverso l'analisi degli RNA messaggeri. Nelle piante sono molti i geni che entrano in gioco solo in momenti cruciali del ciclo dell'albero o in singoli processi, come ad es. la maturazione del frutto. Conseguentemente è divenuto indispensabile conoscere i trascritti, dai quali risalire poi ai geni che determinano il fenotipo. Molte tecniche sono ormai convenzionalmente adottate per individuare i geni differenzialmente espressi in risposta a uno stimolo o a una elicitazione esterna. Il risultato di queste ana-

lisi ha arricchito le banche di sequenze EST facilitando l'individuazione dei geni realmente coinvolti nei processi fisiologici e metabolici e distinguendoli da quelli non legati ad alcuna funzione (pseudogeni e geni "spazzatura").

d) *MAS - selezione molecolare assistita*. Lo sviluppo di marcatori è alla base della selezione molecolare precoce e assistita (MAS). Questa si avvale di marcatori dei caratteri monogenici o di sequenze geniche e di QTL per quelli poligenici. La ricerca ha già messo a disposizione numerosi lotti di marcatori utili per la selezione delle resistenze geniche a vari patogeni, fra cui *Venturia inaequalis* ed *Erwinia amylovora* in melo e pero. Sono anche stati individuati vari RGA (analoghi dei geni di resistenza) per la selezione in pero e albicocco. Altri marcatori sono stati sviluppati in funzione della qualità dei frutti (QTLs per la durezza, dolcezza, acidità della mela e della albicocca) e in funzione della salubrità del frutto fino a poter potenzialmente condurre selezione negativa per l'allergenicità o altri caratteri indesiderati.

e) *Nuove strategie di MG (miglioramento genetico)*. Alcuni strumenti della genomica permettono di identificare nuove strategie per i programmi di breeding, per la selezione di nuove varietà portatrici di geni di resistenza attraverso piramidizzazione e quindi selezione congiunta di più geni. Si cerca anche di realizzare l'introgresione genica multipla nella progettazione di nuovi genotipi e di manipolare e trasferire, per via transgenica, geni utili per la produzione o per migliorare la qualità. Tuttavia le piante GM (geneticamente modificate) sono ancora viste con circospezione, o temute o rifiutate da gran parte dell'opinione pubblica.

A) LA GENOTIPIZZAZIONE E IL "FINGERPRINTING" IN FRUTTICOLTURA

La genotipizzazione rappresenta la definizione del genotipo di una specie, o varietà o "taxa" che sottende e origina un determinato fenotipo. Accettando questo enunciato un po' riduttivo occorre conoscere gli strumenti operativi, metodologici (ormai molto diversificati) del "fingerprinting", cioè dell'"impronta digitale" del DNA. Negli ultimi quindici anni, infatti, le tecniche di "fingerprinting" per determinare il profilo molecolare del materiale genetico propagato dai vivaisti in frutticoltura si sono avvalse di marcatori molecolari altamente polimorfici; fra questi si citano i microsatelliti o SSR (*Simple Sequence Repeat*) e gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), in grado di rilevare differenze genetiche che il fenotipo non sempre riesce a evidenziare (Bianchi et al., 2002; Venturi et al., 2002). Tali marcatori si sono rivelati utili anche per risolvere casi di sinonimia (cioè di somiglianza genetica

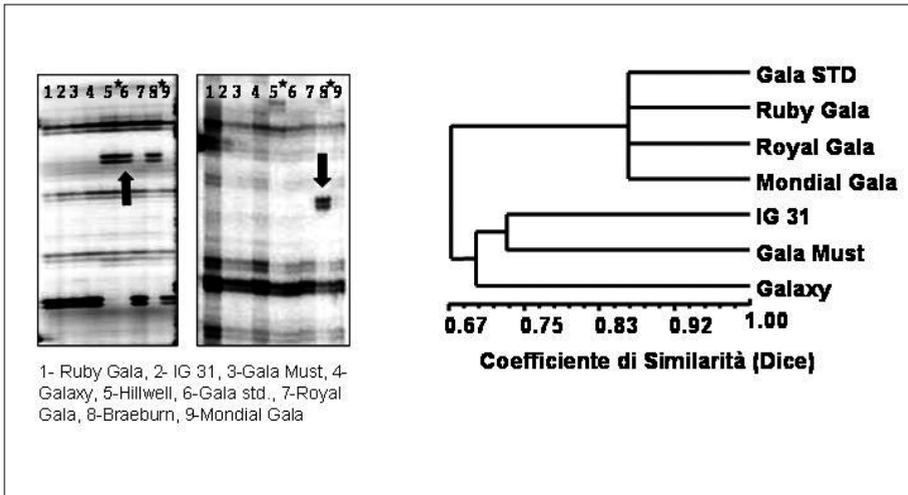


Fig. 1 Esempio di utilizzo di marcatori specifici per retrotrasposoni S-SAP (*Sequenze-Specific Amplified Polymorphism*) nel riconoscimento di mutanti clonali di melo. 14 combinazioni di primer S-SAP discriminano 7 cloni della cv 'Gala' e un clone ('Hillwell') di 'Braeburn' (da Venturi et al., 2006)

e fenotipica fra accessioni che portano nomi diversi) o di omonimia (quando due diverse accessioni portano lo stesso nome).

Il "fingerprinting" quindi rappresenta uno strumento di garanzia richiesta per la registrazione, per la protezione dei diritti di proprietà intellettuale (in aggiunta alla scheda pomologica) delle nuove varietà e, in caso di controversie commerciali, per fornire elementi probanti di rispondenza genetica (es. certificazione vivaistica).

Nelle specie arboree da frutto uno dei limiti del "fingerprinting" deriva dal fatto che per alcune di esse (es. melo, pero, agrumi) esistono più cloni per singole varietà. Questi cloni differiscono in minima parte a livello del DNA, probabilmente per effetto di piccole mutazioni geniche cosiddette "puntiformi", molto difficili da individuare. Per questo motivo, una delle possibili vie per la discriminazione genetica delle varietà policlonali, va ricondotta all'origine stessa della mutazione gemmaria: la mobilità, nei singoli cromosomi, di elementi genetici trasponibili quali i retrotrasposoni o la sostituzione di singoli nucleotidi costituenti la sequenza genica denominati SNP (polimorfismo dei singoli nucleotidi, la cui pronuncia in italiano, è "snip").

Una delle tecniche più recenti e con maggiori potenzialità polimorfiche, a livello delle mutazioni, almeno per quanto riguarda le specie melo e pero, è denominata S-SAP (*Sequenze-Specific Amplified Polymorphism*) con la quale

si è riusciti a discriminare in melo i cloni mutanti delle cv. 'Gala' e 'Braeburn' (Venturi et al., 2006) utilizzando quali marcatori i retrotrasposoni (fig. 1). Tale risultato è stato reso possibile dall'uso di 14 combinazioni di primer (7 primer AFLP accoppiati con 2 primer disegnati su sequenze LTR, *Long Terminal Repeat*, dominio caratteristico di retrotrasposoni). A titolo di verifica, sugli stessi campioni, era stata condotta, senza evidenziare polimorfismi, l'analisi di 30 marcatori SSRs del melo (distribuiti nei 17 cromosomi della specie) e di oltre 1000 marcatori AFLP. Questo assai promettente risultato è stato confermato per la specie pero, nella quale è stata differenziata la cv William dai suoi mutanti clonali "rossi", 'Max Red Bartlett', 'Rosired' e 'Sensation' (Venturi et al., in press).

Com'è noto, cloni mutanti giunti alla propagazione commerciale sono in genere originati da mutazioni spontanee; queste, molto spesso hanno natura chimerica e quindi risultano instabili e soggette, nel tempo, alla possibile regressione del carattere mutato. Ad es., il fenotipo a buccia rossa della pera 'Max Red Bartlett' è andato gradualmente regredendo, in oltre un trentennio, tanto che nei frutteti è molto frequente la presenza di alberi o branche con pere interamente chimeriche (giallo-rosso screziato longitudinalmente). Probabilmente bisognerebbe verificare se la tecnica dei retrotrasposoni, più sensibile di altre nell'individuare e rivelare polimorfismi (dipendenti dalla localizzazione genica di singoli retrotrasposoni), non possa essere influenzata dalla stessa instabilità del genoma mutato, in quanto chimerico.

Anche l'analisi dei polimorfismi marcati da singoli nucleotidi (SNP) si è rivelata molto utile per la genotipizzazione in quanto in grado di distinguere varianti alleliche di geni conosciuti. Lo sviluppo di marcatori SNP, infatti, ha fornito un nuovo e potente metodo di tracciabilità di filiera, permettendo di riconoscere le varietà di origine nei prodotti trasformati. Un esempio è costituito dalla capacità discriminatoria di genotipi di olivo, attraverso l'individuazione di SNPs all'interno di sequenze funzionali (Baldoni com. pers.). Per identificare tali SNPs e rendere più semplici e ripetibili le relative analisi, sono state sintetizzate sonde specifiche PNA (acronimo di acidi nucleici peptidici), che, di fatto, sono nuovi analoghi DNA/RNA completamente artificiali. Il risultato conseguito è stato spettacolare, perché sono state inequivocabilmente discriminate varietà di olivo grazie alla loro specificità verso determinati SNPs. La tecnica, rivelatasi funzionante, è stata estesa alla tracciabilità degli olii di oliva; nella fattispecie è stato possibile risalire al riconoscimento delle varietà di origine (ad esempio le varietà 'Ogliarola Leccese' e 'Canino' si possono distinguere anche nei rispettivi olii). La validità di questi marcatori SNP e la loro applicabilità

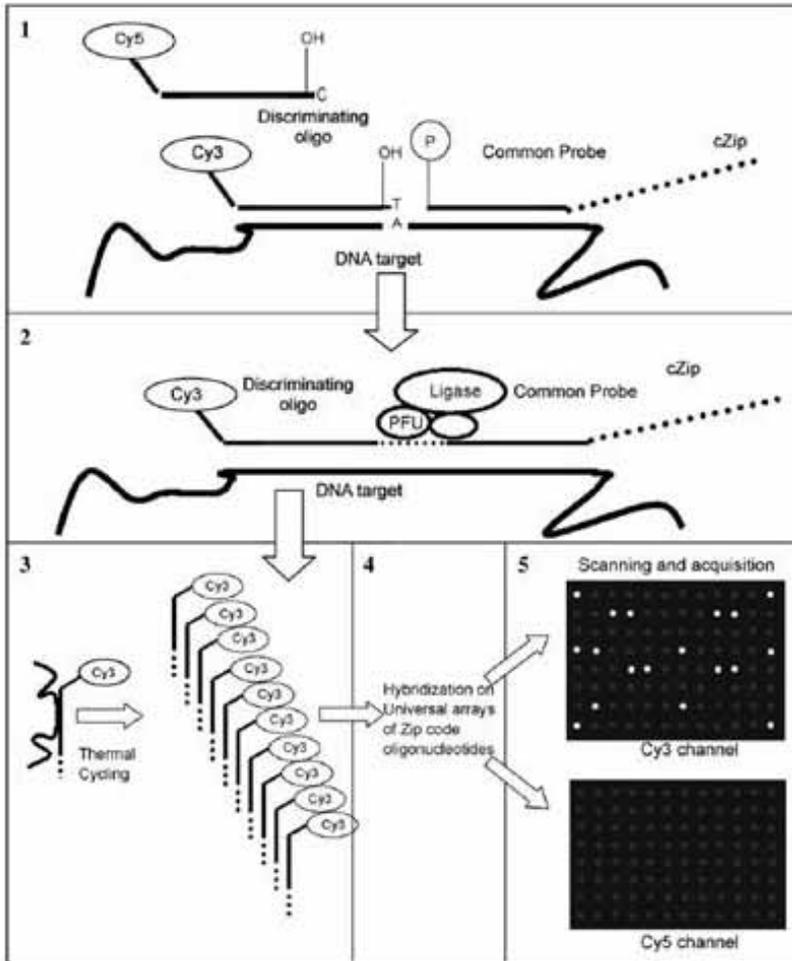


Fig. 2 Schema della metodologia fluorescente LDR-UA (Ligation Detection Reaction - Universal Array) in cui 3 sonde sono in competizione per marcare uno SNP. 1) Appaiamento delle sonde: una sonda comune con zip-code (sequenza nucleotidica artificiale che si appaia in una specifica posizione in un array di sequenze) si lega al prodotto di PCR che funziona da stampo, in posizione subito a valle del nucleotide polimorfico. Due sonde allele-specifiche sono disegnate in modo da avere all'estremità 3' o il nucleotide corrispondente all'allele wild-type o quello corrispondente all'allele variante. Le sonde sono marcate con due diverse fluorocromi (Cyt 3 e Cyt 5). 2) Solo la sonda allele-specifica perfettamente complementare al DNA target (e riconoscibile grazie al fluorocromo) può essere ligata alla sonda comune. 3) Marcatura delle varianti alleliche in cui sono presenti gli SNP. 4) Ibridazione con un "array universale" in cui sono spottati gli zip-code delle sonde comuni in posizione nota. 5) Scansione con camera confocale dei fluorocromi e discriminazione degli SNP (da Consolandi et al., 2007)

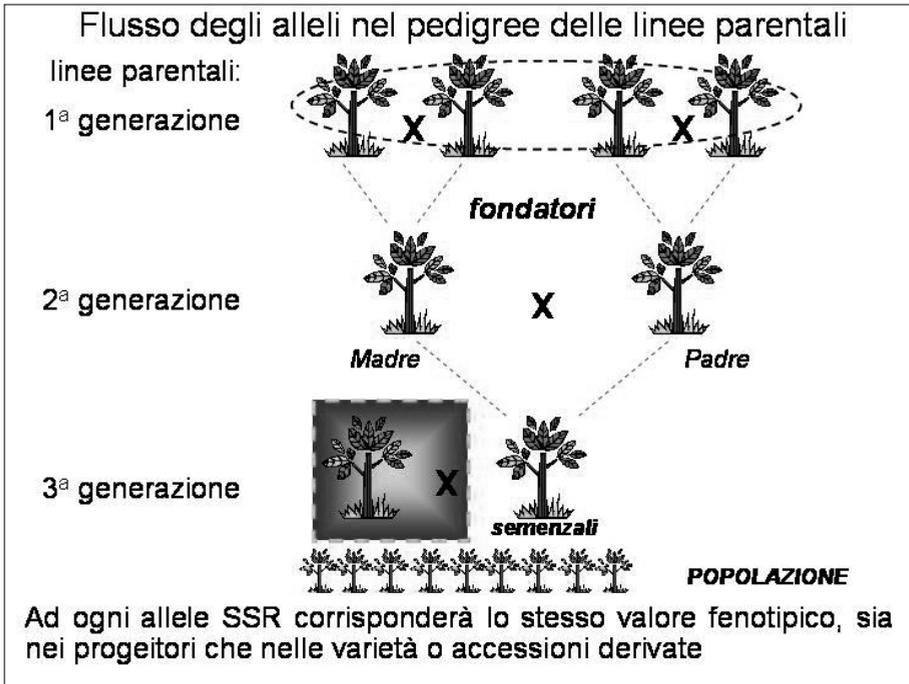


Fig. 3 Schema per una analisi di “family genotyping”: l’analisi con microsatelliti (SSR) permetterà di seguire il flusso degli alleli SSR (e il fenotipo per i caratteri associati) derivati dalle linee ascendenti e ritrovati nei discendenti

alla tracciabilità degli olii è confermata, sempre dagli stessi autori e in parallelo, anche con la tecnologia a fluorescenza LDR-UA (Ligation Detection Reaction - Universal Array; fig. 2) la quale ha prodotto risultati molto simili (Consolandi et al., 2007; Consolandi et al., 2008).

Un altro recente approccio di genotipizzazione, molto utile per il miglioramento genetico è il *Family genotyping* (o genotipizzazione via “pedigree”) in quanto capace di recuperare, trasferendoli alle progenie da incrocio, alleli favorevoli per qualsiasi carattere presente nel germoplasma conservato di una determinata specie, anche in assenza di ampie popolazioni di incrocio (van de Weg et al., 2004).

Da tale approccio si può ricavare l’associazione fra alleli SSR, marcatori per un carattere di interesse agronomico, e relativo fenotipo, prendendo in esame i genotipi e fenotipi di almeno due generazioni di linee parentali

ascendenti (cioè di genitori e nonni), perché caratterizzano intere regioni cromosomiche (in cui sono presenti geni che controllano i caratteri e i QTLs relativi) tenendo conto delle relazioni di parentela. Per questo viene definita “genotipizzazione familiare” (fig. 3).

In pratica, a ogni allele SSR corrisponderà lo stesso valore o carattere fenotipico, sia nei progenitori che nelle varietà o accessioni derivate. Si potrà pertanto procedere a selezionare genotipi dei semenzali ottenuti.

Un esempio applicativo della tecnica ci viene ancora da van de Weg et al. (2004), che hanno definito il carattere “durezza della polpa della mela”, utilizzando marcatori microsatelliti che erano stati mappati nelle regioni genomiche dei relativi QTL. Grazie a tale studio sono state identificate una serie di varianti alleliche per la durezza del frutto oggi a disposizione per i programmi di miglioramento genetico.

Un altro campo di applicazione della genomica è costituito dalla genotipizzazione degli alleli del locus S, la regione che regola il meccanismo dell’inibizione della fertilità autogama (autoincompatibilità gametofitica), diffusa in varie specie (in particolare in melo, pero, ciliegio).

Tale meccanismo è innescato da proteine codificate da geni posizionati nel locus S, i quali, nel caso di autoincompatibilità, determinano il blocco della crescita del tubetto pollinico dello stesso genotipo o di altro genotipo avente gli stessi alleli. Questo fenomeno, nelle Rosaceae, è mediato da una ribonucleasi (S-RNasi), un enzima stilare, le cui forme interagiscono con proteine polliniche (codificate da geni con domini F-box) che insieme determinano l’arresto della crescita del tubetto pollinico (a circa 1/3 dell’altezza dello stilo), impedendo pertanto l’autofecondazione; in tal caso (fig. 4) l’RNasi stilare, se non viene complessata con proteine F-Box e inattivata, degrada gli RNA del tubetto e ne inibisce la crescita.

Le S-RNasi sono ben conosciute ed è possibile, via PCR, distinguere i diversi alleli presenti nelle singole varietà e prevedere la compatibilità delle varietà negli incroci, come è stato fatto per il pero (Goldway et al., 2008). I marcatori di tali mediatori sono rivelati da primer disegnati direttamente sulla sequenza genica delle RNasi e hanno una altissima efficienza grazie alla presenza di regioni-specifiche, per ogni singolo allele, che consentono di identificare con facilità i polimorfismi fra le diverse varietà appartenenti a una stessa specie (fig. 5).

La letteratura sulla genotipizzazione degli alleli S nelle specie afferenti alla famiglia delle Rosaceae è molto ampia: i primi dati sono stati riportati da Brothaerts et al. (1996) nel melo, da Ishimizu et al. (1999) in pero giapponese e da Zuccherelli et al. (2002) nel pero europeo. Pertanto, in tali specie sono

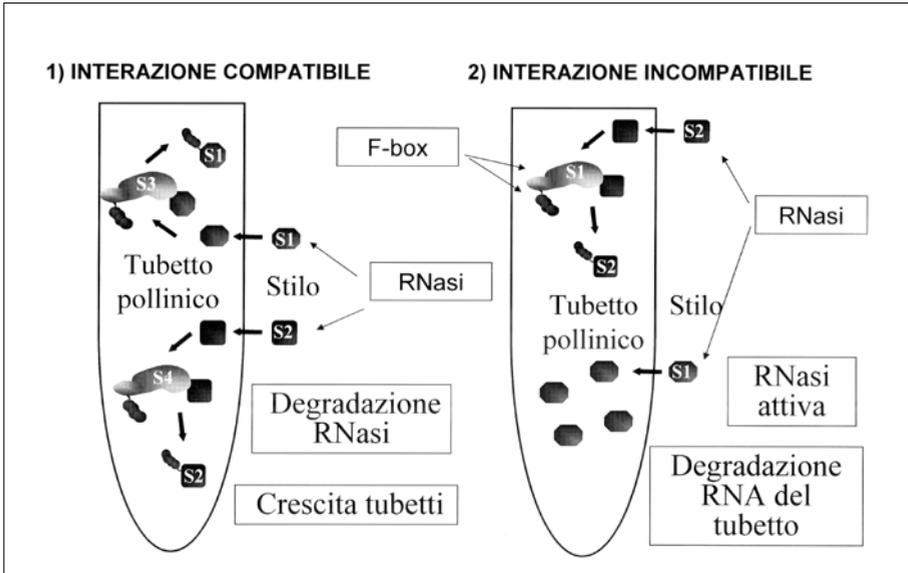


Fig. 4 Incompatibilità gametofitica nelle Rosacee. Schema del ruolo delle ribonucleasi (RNasi, S) e dei determinanti pollinici (F-Box) nella interazione compatibile (1) e incompatibile (2) fra polline e stilo

identificabili decine di alleli di S-RNasi (gli alleli S). Gli alleli S sono molti, una serie infinita, come è stato dimostrato da Goldwin et al. (2008): in pratica, più si indaga a livello varietale, più il numero di alleli aumenta.

Mentre le S-RNasi sono oggetto di studio da molti anni, l'identificazione della componente pollinica (S F-box) dell'incompatibilità gametofitica fa parte di acquisizioni recenti. Nella famiglia delle Rosaceae, infatti, sono stati caratterizzati alcuni di tali geni in mandorlo da Ushijima et al. (2003), in albicocco da Romero et al. (2004), in ciliegio da Ikeda et al. (2005), in pero giapponese e melo da Sassa et al. (2007) e i risultati ottenuti sono importanti per la comprensione dei meccanismi di sterilità oltre che quale supporto alla genotipizzazione delle varietà. Quest'ultima diventerà molto utile per la scelta dei parentali negli incroci programmati, inoltre, si spera dovrebbe aprire spiragli per il superamento della sterilità gametofitica, come è avvenuto già nel ciliegio dolce (*Prunus avium*), ancorché, in tale specie, l'autofertilità sia stata provocata da una provvidenziale mutazione del locus S, sottoponendo il polline a trattamenti irradianti. Nel nashi, pero giapponese, invece un mutante autofertile è stato casualmente individuato nella cv Nijisseiki.

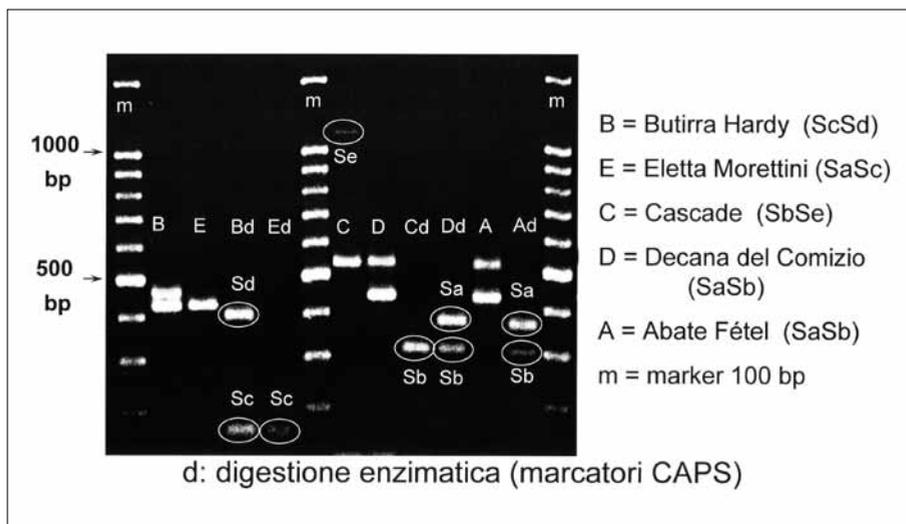


Fig. 5 Identificazione di alleli S (*S-RNasi*) via S-PCR (PCR per amplificare gli alleli S). Per discriminare gli alleli S si utilizza la tecnica CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence) in cui i prodotti di amplificazione della PCR sono digeriti (d) con enzimi di restrizione

B) MARCATORI DI GENI FUNZIONALI E MAPPE GENETICHE

La sempre maggiore disponibilità di sequenze geniche nelle banche dati a supporto delle analisi genomiche sta facendo evolvere il concetto di marcatore molecolare. I primi marcatori molecolari erano in qualche modo “a-specifici” e si disponevano “random” lungo i vari cromosomi, senza poter identificare sequenze con funzione specifica.

I nuovi marcatori funzionali, invece, si distinguono dai marcatori “random” perché sono parte integrante di geni funzionali di interesse agrario (fig. 6). Questa caratteristica li rende massimamente associati ai caratteri propri di tali geni, in quanto non ci può essere ricombinazione fra marcatore e carattere scelto. La loro applicazione è molto semplificata dalle tecniche PCR sufficientemente efficienti per identificare polimorfismi fra le diverse varianti geniche delle singole varietà. Fra queste ci sono gli SCAR (*Sequence Characterize Amplified Region*), i CAPS (*Cleavage Amplified Polymorphic Sequence*), gli SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e gli SSR (*Simple Sequence Repeats*) quando il microsatellite è interno al gene.

L'importanza dei marcatori sequenza-specifici viene esaltata dalle mappe genetiche ben saturate, soprattutto di microsatelliti, per poter condurre ana-

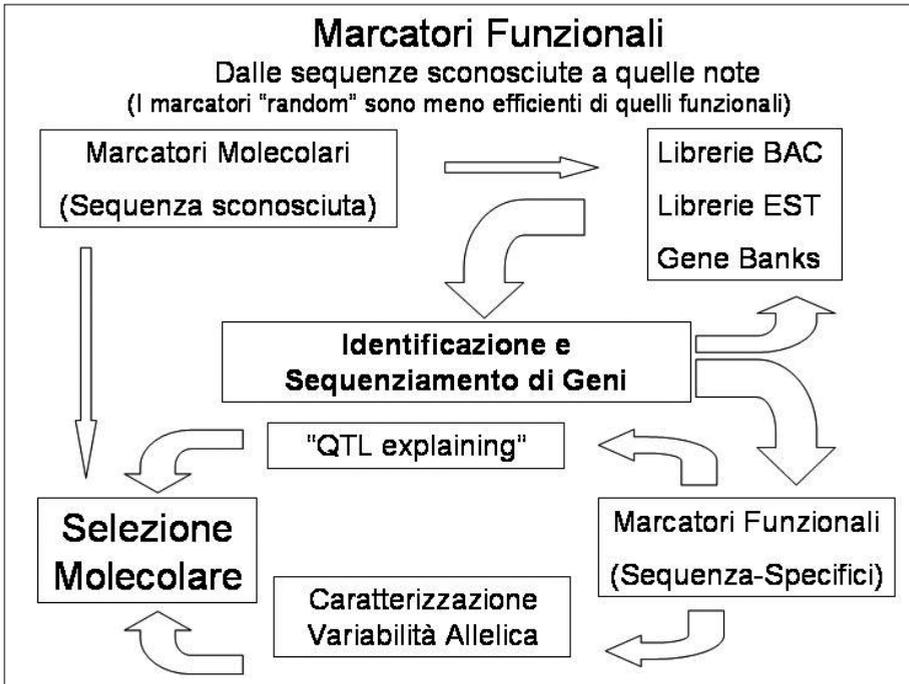


Fig. 6 Percorso di marcatori molecolari "random" e di marcatori funzionali capaci di guidare la selezione molecolare assistita (MAS)

lisi genomiche approfondite. Ormai sono disponibili numerose mappe genetiche per varie specie: melo (Maliapaard et al., 1998; Liebhard et al., 2002 e 2003; Kenis e Keulemans, 2006), pero (Yamamoto et al., 2002; Dondini et al., 2004), pesco (Dirlewanger et al., 2002; Verde et al., 2005), albicocco (Hurtado et al., 2002; Vilanova et al., 2003; Lambert et al., 2004; Dondini et al., 2007), ciliegio (Wang et al., 1998). Un'importante mappa, nota come *Prunus Reference Map* (Joobeur et al., 1998 e 2000; Dirlewanger et al., 2004), derivata dall'analisi della popolazione di un incrocio interspecifico, mandorlo x pesco (Texas x Earlygold), è stata utilizzata per mappare i marcatori genotipizzanti all'interno delle specie del genere *Prunus*. Grazie alle sintenie fra melo e pero (Yamamoto et al., 2001; Pierantoni et al., 2004) e fra le specie del genere *Prunus* (Dirlewanger et al., 2004; Dondini et al., 2007) nonché alla trasferibilità dei microsatelliti all'interno delle specie appartenenti alle Rosacee, le citate mappe sono state allineate e i gruppi di associazione sono stati caratterizzati con molta precisione.

Come se non bastasse, con le suddette analisi genomiche, sono stati individuati anche numerosi QTL, ovvero regioni genomiche che controllano i

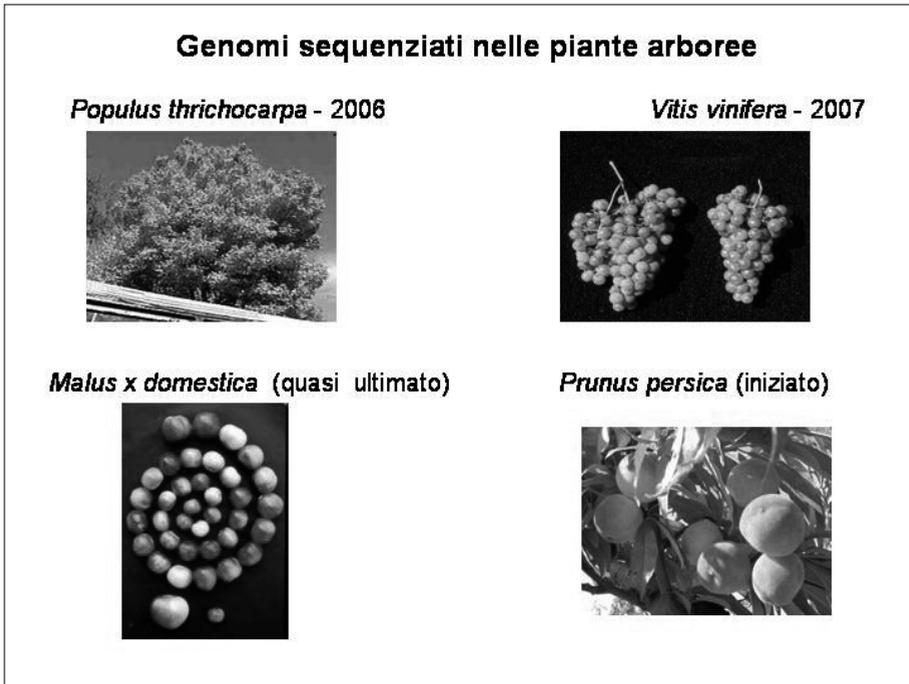


Fig. 7 Genomi di specie arboree già sequenziati o in fase di sequenziamento

caratteri quantitativi (*Quantitative Trait Loci*) di interesse agronomico, e che sono di natura poligenica: si tratta di QTLs per la resistenza a ticchiolatura del melo (Durel et al., 2004) e del pero (Pierantoni et al., 2007), al colpo di fuoco batterico del pero (Dondini et al., 2004) e del melo (Calenge et al., 2005; Khan et al., 2006 e 2007) e per caratteri della “qualità” e della maturazione dei frutti di varie pomacee (King et al., 2000; Liebhard et al., 2003) e drupacee (Dirlewanger et al., 1999; Wang et al., 2000; Quilot et al., 2004; Sansavini et al., 2006). Tutte queste ricerche hanno ovviamente avuto come principale finalità lo sviluppo di marcatori utili per la selezione assistita nel “breeding” molecolare (cfr. successivo capitolo sulla MAS).

I marcatori funzionali che mappano nelle regioni genomiche caratterizzate dalla presenza di QTLs associati ai caratteri oggetto di studio, indicano anche, per ciascun gene, quali alleli sono più vantaggiosi per il “breeding”.

Grazie alla conservazione dei domini funzionali di molte classi di enzimi si possono scoprire marcatori funzionali utili ai fini del trasferimento di informazioni gene-specifiche da una specie all'altra, con altissima efficienza, quali *Fragaria*, *Malus* e *Prunus* (Sargent et al., 2008). A loro volta, tali marcatori

servono per allineare le mappe delle specie appartenenti alla famiglia delle Rosaceae.

Lo sviluppo di questi strumenti, grazie al sequenziamento del genoma di varie specie (fig. 7), diviene un obiettivo facilmente raggiungibile, come nella vite (Jaillon et al., 2007 e Velasco et al., 2007), nel melo (in via di completamento allo IASMA di Trento) e di prossima realizzazione, come nel pesco (con il progetto “Drupomics” del MIPAAF). Non solo si individuano i marcatori funzionali che caratterizzano regioni genomiche in cui sono presenti i geni e i QTL ma si vuole anche esplorare la variabilità all’interno dei genotipi candidati a essere scelti come linee parentali nei programmi di breeding. Con il sequenziamento della vite, ad esempio, sono stati identificati 43 geni coinvolti nella sintesi degli stilbeni, fra i quali il resveratrolo, importante per la salute umana, ma anche altri geni coinvolti nella biosintesi di vari metaboliti secondari che concorrono a definire la qualità del vino (Pé, 2008).

Tappa successiva al sequenziamento genomico di una specie sarà il risequenziamento della stessa, ma a livello di singole varietà. La sequenza della specie servirà come riferimento (Jackson et al., 2006; Lijavetzky et al., 2007), e le tecniche robotizzate, ormai disponibili, ne faranno scendere decisamente il costo. Viene ipotizzato, a breve, un possibile costo di soli 1000 \$ per genoma sequenziato, rispetto agli oltre 10.000 attuali. Nel caso della vite, queste moderne tecnologie saranno le uniche in grado di estendere ai diversi vitigni l’analisi delle migliaia di marcatori funzionali individuati grazie al sequenziamento dell’intero genoma e l’utilità di queste conoscenze andrà a supporto dei programmi di miglioramento genetico per ricercare nuovi caratteri da inserire in nuovi vitigni appositamente programmati (Pé, 2008; Velasco, 2008). Per alcuni decenni in Italia è stata praticata nelle viticoltura da vino soltanto la selezione clonale all’interno dei vitigni più affermati. Lo sviluppo di tecniche di confronto degli stessi geni in genotipi diversi è la base per identificare anche i polimorfismi del singolo nucleotide da utilizzare nella genomica funzionale della vite, per la quale ne sono ormai disponibili alcuni milioni (Lijavetzky et al., 2007; Velasco et al., 2007).

Queste conoscenze inoltre potranno aprire la strada all’utilizzo, anche nelle specie arboree, delle tecniche di “genetica inversa” (reverse genetics), ovvero il silenziamento (“gene silencing”) o la inattivazione (“gene disruption”) di geni specifici per evidenziarne la funzione osservando i fenotipi mutati. Queste tecniche sono utilizzate sin dalla fine degli anni ’90 in specie modello come *Arabidopsis* in cui la fenotipizzazione delle mutazioni è molto semplice (Resky, 1998). Fino a oggi, le informazioni sulla espressione (anche differenziale) dei geni, derivate dalle librerie a cDNA e dai microarray, e le relative se-

quenze, facilmente reperibili nelle banche dati di EST, hanno guidato questo “percorso a ritroso” per la conoscenza della funzione genica.

Altra nuova prospettiva è offerta dalla tecnologia del Tilling (*Targeting Local Lesions in Genomes*). Si tratta di una tecnica in grado di generare la mutazione di un gene di interesse (“gene target”). Questa tecnica è applicabile a qualunque specie mutagenizzabile e per ora è stata utilizzata in *Arabidopsis thaliana*, pomodoro, lattuga, frumento e mais. Dal confronto fra piante mutanti e piante standard (“wild-type”) si individua la funzione di un gene “target”. L'estensione a specie arboree è però difficile a causa dell'alto livello di eterozigosi e del limitato numero di individui ottenuti per incrocio, nonché a causa della lunghezza dei cicli di fruttificazione degli alberi (Busov et al., 2005). Ciò non toglie che proprio sulla caratterizzazione dei mutanti, in genere spontanei delle varietà arboree policlonali, si giocherà una parte importante dei futuri obiettivi del miglioramento genetico fruttivitecologico. Il campo di studio in cui tale approccio sembra più favorevole è lo sviluppo del colore della bacca sulla vite (Kobayashi et al., 2004), della buccia della mela (Espley et al., 2007; Takos et al., 2006; Chagné et al., 2007) e della pera (Dondini et al., 2008).

C) GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI E TRASCRITTOMICA

Un approccio, estremamente efficiente, per identificare geni coinvolti nel controllo di caratteri agronomicamente utili è quello dell'*analisi dei geni differenzialmente espressi* in risposta a uno stimolo o elicitazione esterna o a una particolare induzione metabolica. Dall'analisi dei trascritti (mRNA) si identificano i geni espressi in risposta a tali stimoli e le relative sequenze diventano disponibili per ottenere marcatori funzionali.

L'analisi dell'intero *profilo trascrizionale* della pianta in una determinata fase metabolica – corrispondente a una ben definita fase fenotipica – fornisce una valida e poco onerosa alternativa ai progetti di sequenziamento in larga scala delle “librerie di espressione”, progetti i quali però hanno avuto il merito di arricchire le banche dati di sequenze molto informative. Un caso emblematico dell'utilità delle sequenze espresse nella pesca per arrivare a identificare i geni coinvolti nella maturazione del frutto è costituito dal progetto del Consorzio interuniversitario italiano ESTree (<http://www.itb.cnr.it/estree>). A seguito di questo enorme sforzo di sequenziamento è stato sintetizzato un “chip” (Peach 1.0.) per analisi “microarray” col quale si possono analizzare i geni espressi durante le diverse fasi della maturazione del frutto del pesco

(Trainotti et al., 2006, 2007). Tale “chip” ha notevolmente semplificato la comprensione della funzione dei vari geni coinvolti nella regolazione etilenica della maturazione.

Anche nella mela, grazie alla disponibilità di uno specifico “chip”, è iniziato lo studio dello sviluppo degli aromi in risposta all’etilene (Schaffer et al., 2007). Analoghi lavori sono stati condotti anche in fragola da Salentijn et al. (2003) e da Terrier et al. (2005) in vite. Da questi lavori sono derivate sequenze geniche utilizzabili per sviluppare marcatori funzionali associati a processi fisiologici specifici. Sono, queste, tappe indispensabili per approfondire e rivisitare molti processi e aspetti fisiologici connessi a pratiche agronomiche (es. potatura, concimazione, rizogenesi, ecc.).

Per quanto riguarda le analisi differenziali dei geni espressi, si citano fra le prime tecniche di *transcript profiling* (analisi di tutti i geni espressi), il *Differential Display* (Liang e Pardee, 1992), poi migliorato con la tecnica cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996), con la quale risulta facile l’individuazione delle sequenze, perciò ideali per lo sviluppo di marcatori funzionali. Altre tecniche si sono rese utili per questo tipo di analisi: il *cDNA differential screening* (Yoshida et al., 1994), la *PCR-based suppression subtractive hybridization* (Diatchenko et al., 1996), i *microarray* (Schena et al., 1995). Queste tecnologie in grado di analizzare contemporaneamente tutti i geni espressi in risposta a uno stimolo hanno gradualmente introdotto il concetto di *trascrittomica* (cioè la determinazione di tutte le sequenze espresse dall’individuo).

Un esempio della possibilità di integrare questi approcci magnificandone i risultati è dato dallo studio dei profondi cambiamenti metabolici indotti dal gene *HcrVf2* in melo in risposta all’infezione del fungo patogeno *Venturia inaequalis* (fig. 8). Nella fattispecie sono state poste a confronto alcune linee di ‘Gala’ geneticamente modificate per l’inserimento del gene *HcrVf2* con un clone di ‘Gala’ normale, non trasformata (Paris et al., 2008). In tal caso, da una libreria sottrattiva è derivata la costruzione di una libreria di 523 geni unici di grande importanza per lo studio delle interazioni fra ospite (pianta di melo) e patogeno (*V. inaequalis*). Tale libreria è stata poi “spottata” su un “chip” per l’analisi “microarray” (Paris et al., 2008) attraverso cui è stata identificata una sottopopolazione di 62 geni (29 indotti e 33 repressi in seguito all’elicitazione fungina) deputati alla codificazione di proteine ed enzimi legati a specifiche funzioni della pianta. Oltre alla caratterizzazione della risposta metabolica assai complessa e derivante dall’interazione ospite/patogeno (nella fattispecie alterata dall’inserimento nella pianta della sola sequenza *HcrVf2*), grazie alle sequenze dei geni identificati si possono ricavare nuovi marcatori funzionali associati ai geni coinvolti nella risposta difensiva della pianta al

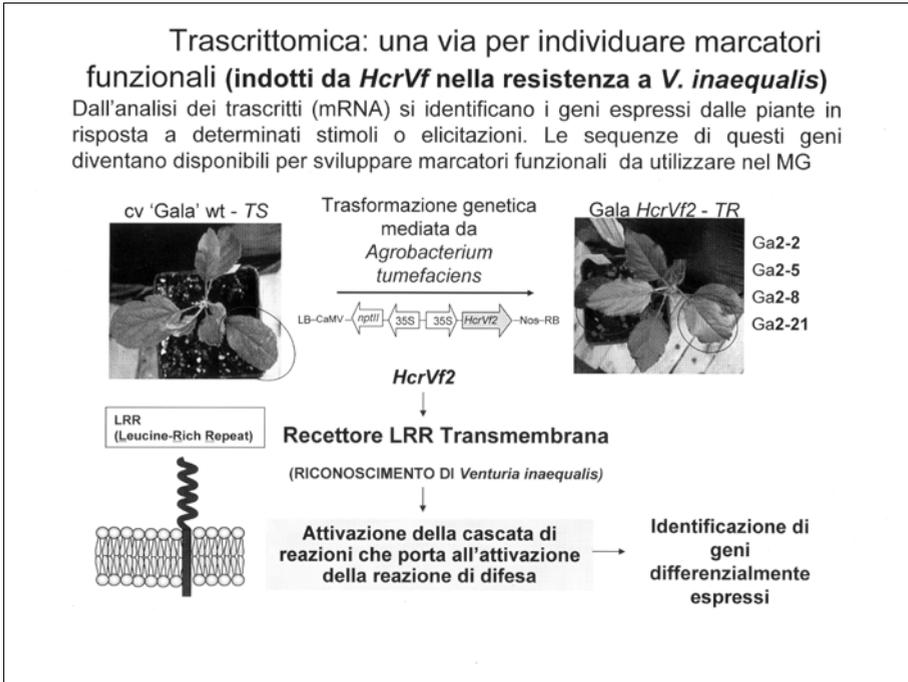


Fig. 8 Applicazione della trascrittomica per identificare geni espressi in risposta a stress biotici. Il caso della risposta di "resistenza" del melo a *Venturia inaequalis*

patogeno. Fra questi geni, si cita un'endochitinasi di classe III (Paris et al., 2006) che in parte spiega, probabilmente, il meccanismo di resistenza indotta dal gene *Vf*.

Un identico approccio è stato seguito da altri autori (Norelli et al., 2008) che hanno identificato un pool di geni espressi nelle prime 72 ore dall'inoculazione di *Erwinia amylovora* in melo. Fra questi geni sono compresi alcuni enzimi, quali una polifenol-ossidasi, una cinnamyl-alcool-dehydrogenasi e diverse proteine chinasiche.

Questi primi approcci di *trascrittomica* dovranno in futuro essere integrati con successivi studi di *proteomica* e *metabolomica* per la comprensione delle vie biosintetiche che regolano la sintesi dei metaboliti primari e secondari che determinano, fra l'altro, la "qualità dei frutti". Tutte queste nuove informazioni, sempre più facilmente ottenibili grazie alle piattaforme tecnologiche, dovranno essere utilizzate anche per lo sviluppo di marcatori funzionali per la successiva selezione assistita (MAS) (Sansavini et al., 2005; Sansavini, 2008).

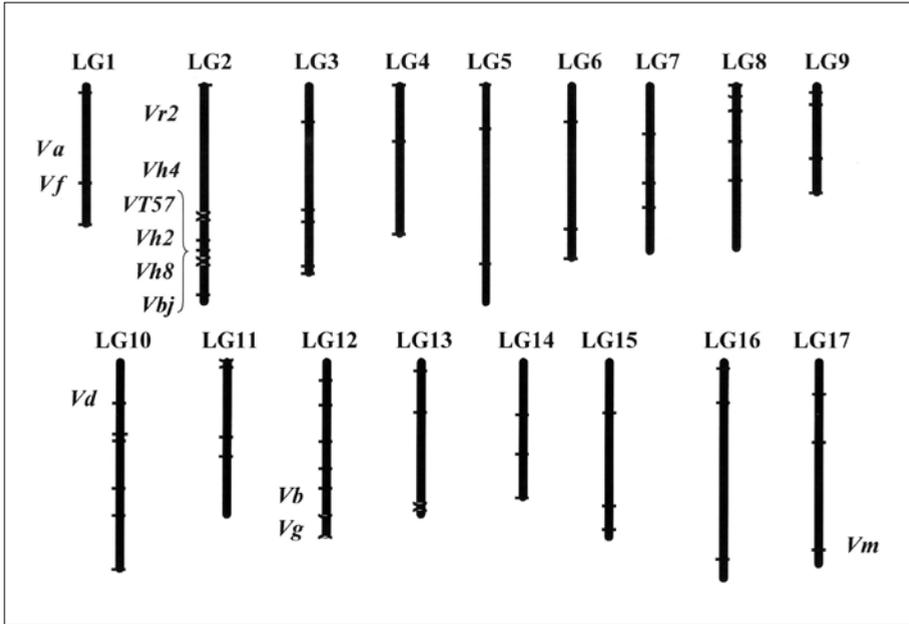


Fig. 9 Localizzazione dei diversi geni di resistenza a *Venturia inaequalis* nel genoma del melo (modificato da Gessler et al., 2007)

D) LA SELEZIONE ASSISTITA CON MARCATORI MOLECOLARI (MAS),
A SUPPORTO DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

La selezione assistita e precoce con marcatori molecolari (cosiddetta “marker assisted selection” o MAS) è una tecnica di selezione indiretta che si basa sull’associazione fra un carattere di interesse agronomico (es. resistenza a uno stress) e un marcatore molecolare. Si analizza per la selezione direttamente il genotipo (scevro dai condizionamenti dell’ambiente o dello stadio di sviluppo della pianta) per ridurre i tempi, gli spazi occupati e, in definitiva, i costi dei programmi di miglioramento genetico.

Tale strumento a supporto del breeding è di facile e immediata comprensione quando si pensi ai caratteri monogenici, quali ad esempio le fonti di resistenza a ticchiolatura del melo (Gessler et al., 2007; fig. 9) o alcuni caratteri relativi alla qualità del frutto quali, ad esempio, il carattere della polpa gialla/bianca della pesca o anche il locus “D” dell’acidità del frutto (Dirlewanger et al., 2004). Purtroppo la maggior parte dei caratteri di interesse agronomico nelle piante arboree da frutto è di natura poligenica, quindi controllata da diversi geni posizionati in più loci del genoma, i già citati QTL.

In teoria, tutti i marcatori associati ai caratteri quantitativi e qualitativi, possono essere utilizzati nel breeding sotto forma di MAS. Molti protocolli, però, non sono ancora a punto per condurre una selezione multifattoriale, prendendo in considerazione cioè più caratteri contemporaneamente. Sull'efficienza della MAS per i caratteri quantitativi bisogna ancora chiarire alcuni presupposti: se i marcatori identificano un QTL che spiega una alta percentuale della variabilità fenotipica di un certo carattere, essi avranno sicuramente successo; se il modello sperimentale prevede invece molti geni con bassa influenza sul fenotipo, nonostante la conoscenza dei QTL, l'efficienza della MAS potrebbe essere inferiore a quella della selezione per via fenotipica (Morgante e Salamini, 2003).

Esistono alcune strategie per migliorare l'efficienza dei marcatori molecolari e dei QTL per selezionare secondo caratteri quantitativi e in ogni caso bisogna sviluppare approcci di genomica quantitativa più raffinati di quelli fino a oggi impiegati, al fine di sfruttare meglio i QTL identificati.

Una prima via consiste nella validazione dei QTLs in ampie popolazioni di incrocio (fino a 500 semenzali) che segregano per il carattere poligenico in esame. Una alternativa consiste nella "genetica di associazione", ovvero nell'applicazione del cosiddetto *linkage disequilibrium*, che significa fare un'analisi molecolare su ampie collezioni varietali di varianti alleliche di geni candidati (iniziando con quelli che coabitano coi QTLs stessi). Si possono così identificare con precisione le regioni del genoma in cui sono presenti i geni che controllano un carattere e scoprire nuovi alleli favorevoli da introdurre nei programmi di incrocio. Il "linkage disequilibrium" è utilizzato in genetica umana sin dalla fine degli anni '60 (Hill e Robertson, 1968), ma in specie arboree da frutto è stato applicato solo raramente e, a volte non come supporto del miglioramento genetico: Koopman et al. (2007) hanno applicato questo approccio per l'analisi dei flussi di alleli fra le specie selvatiche di melo e quelle addomesticate.

Lo sviluppo di marcatori molecolari per la MAS nelle piante arboree da frutto è stato uno dei temi fondanti dello sviluppo delle biotecnologie ed è stato applicato a sostegno del miglioramento genetico.

Nel campo delle resistenze a patogeni i primi marcatori molecolari sono stati sviluppati per la resistenza a ticchiolatura del melo (Tartarini, 1996; Tartarini, 1999; Vinatzer, 2001; Vinatzer, 2004) in quanto associati al gene *Vfe* mappati nel linkage group 1. Successivamente è stato clonato il gene *HcrVf2* utilizzando una libreria genomica a largo inserto (libreria BAC, Vinatzer et al., 2001) della cv di melo 'Florina' (fig. 10). L'isolamento di tale gene, portatore di una resistenza totale a ticchiolatura, così come l'attività di mappaggio

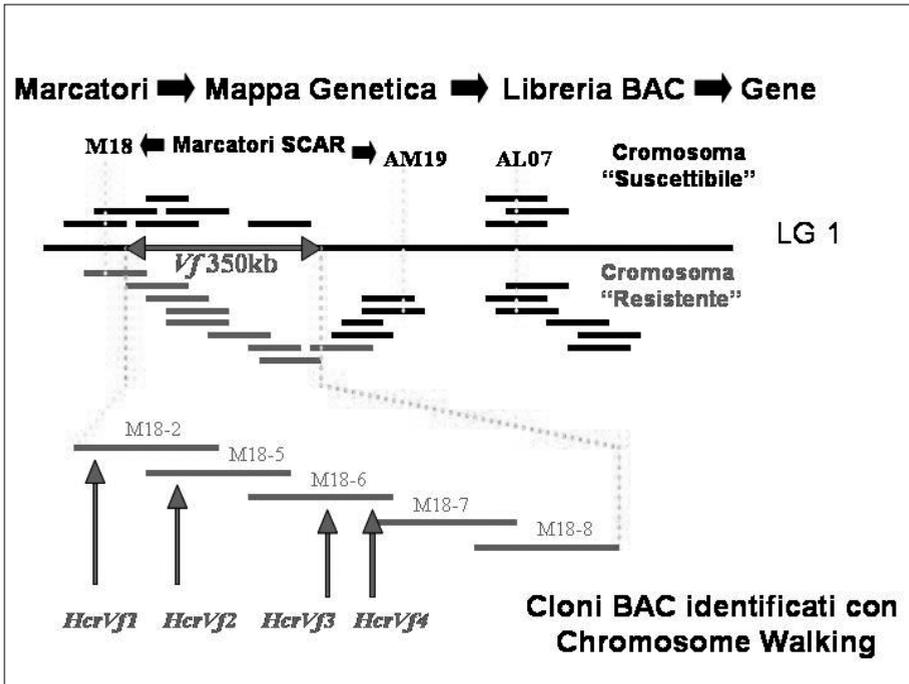


Fig. 10 Ricerca del gene *Vf* (*HcrVf2*) per la resistenza a ticchiolatura del melo. Con questa ricerca di genomica sono stati identificati sia il gene di resistenza sia i marcatori associati al carattere

fine nella regione del *Vf*, da cui l'isolamento e il clonaggio, hanno generato una collezione di marcatori ideali per la MAS perché sono strettamente associati al carattere di resistenza e co-segregano con essa nelle popolazioni di incrocio. La dimostrazione definitiva della effettiva attività del gene *Vf* nel conferire resistenza a ticchiolatura del melo si è ottenuta inserendo tale gene mediante trasformazione genetica nella cv 'Gala', ticchiolatura suscettibile. In questo modo sono state ottenute alcune linee di Gala "geneticamente modificate" e "ticchiolatura resistenti", numerose al pari delle varietà TR (ticchiolatura resistenti) per il gene *Vf* (Belfanti et al., 2004).

In però, altri marcatori associati alla resistenza a ticchiolatura (di natura poligenica) sono stati sviluppati nella cv 'Abate Fétel' (Pierantoni et al., 2007). Per quanto riguarda la resistenza a "fire blight" sono stati identificati quattro QTL nella cv "fire blight" resistente 'Harrow Sweet', i cui marcatori potranno essere utilizzati per la selezione con efficienza fino all'80% di genotipi resistenti a *Erwinia amylovora* (Dondini et al., 2004).

Per l'identificazione di marcatori associati alla resistenza al "fire blight" nel

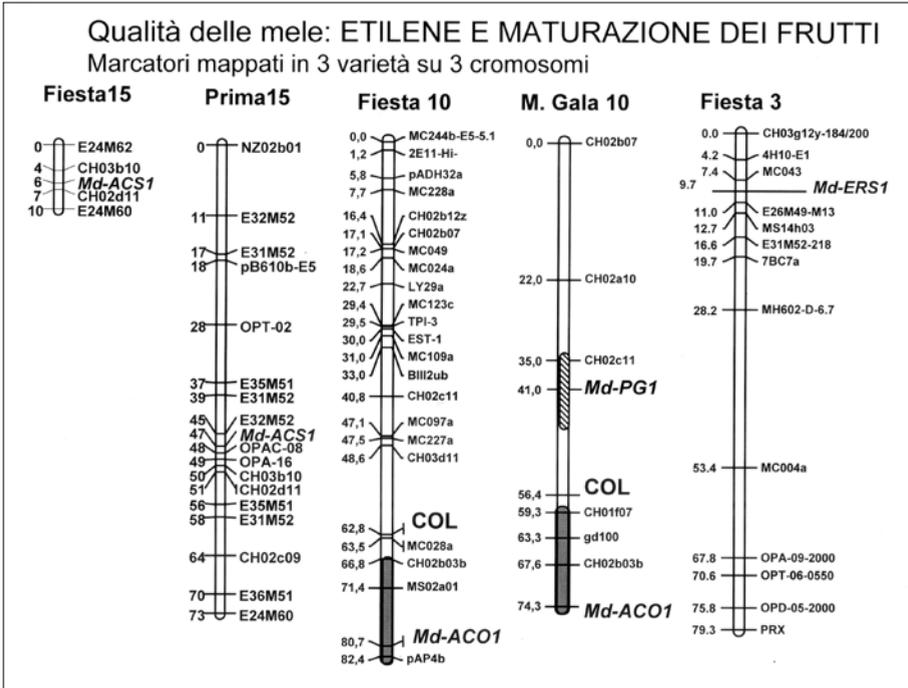


Fig. 11 *Marcatori molecolari associati alla durezza e all'intenerimento delle mele. Nel linkage group 10 è presente sia un QTL per la durezza (sul cromosoma in grigio) che per l'intenerimento (sul cromosoma a barre). I geni per il metabolismo dell'etilene coinvolti nella maturazione della mela, sono mappati sui linkage group 3 (MdERS1), 10 (Md ACO1) e 15 (MdACS1). MdPG1 è un marcatore funzionale per una poligalatturonasi, enzima responsabile dell'intenerimento del frutto (modificato da Costa et al., 2005)*

pero e alla sharka nell'albicocco (Dondini et al., 2004 a e b) è stata utilizzata anche la tecnica degli *“analoghi dei geni di resistenza”* (RGA). Si tratta di una famiglia di geni identificabili grazie a domini conservati e quindi comuni a molte fonti di resistenza presenti nelle piante. Gli RGA sono quindi una sorta di *“comune denominatore”*, preservato dalla natura, per conferire resistenze geniche agli stress biotici, indipendentemente dalla specie di appartenenza.

Alcuni importanti progetti europei, con partnership italiane, sono in corso per lo sviluppo di marcatori molecolari associati alla qualità della frutto (Progetti HiDRAS e ISAFRUIT). I marcatori finora ottenuti saranno utili nella MAS per caratteri importanti quali il peso del frutto, la durezza della polpa, l'acidità e il contenuto in zuccheri del succo, tutti accertabili nei giovani semenzali prima della selezione di campo. Due QTLs, rispettivamente

della durezza e dell'intenerimento della polpa della mela, sono stati trovati nel "linkage group" 10 del melo (fig. 11) in corrispondenza rispettivamente di un gene che codifica per l'ACC-ossidasi (importante step della via biosintetica dell'etilene) e di una poligalatturonasi (Costa et al., 2005). I microsatelliti, in corrispondenza dell'ACC-ossidasi, sono già stati utilizzati per una analisi di "family genotyping" mirata a scoprire diverse varianti alleliche da recuperare e reintrodurre in nuovi genotipi di melo (van de Weg et al., 2004). Inoltre, sempre per la durezza della mela, è stata recentemente descritta una nuova classe di espansine (MdEXP7, Costa et al., 2008) che si posiziona all'interno di un QTL della durezza della polpa nel linkage group 1 del melo cv 'Prima'. Un microsatellite interno alla sequenza dello stesso gene mappa nella stessa posizione anche nel pero (cv 'Harrow Sweet' e 'Passa Crassana') dimostrando così, in entrambe le specie, che la funzione si è conservata. Tale SSR in futuro potrà essere molto utile per implementare l'approccio del "family genotyping" per la durezza delle mele e delle pere.

Un ulteriore settore di ricerca innovativa volta all'individuazione di aspetti nutraceutici e salutistici del frutto riguarda la caratterizzazione delle diverse classi di allergeni nella buccia e nella polpa della mela e di altri frutti. L'allergia alla mela è abbastanza diffusa nel Nord Europa e in misura minore in Italia. Sono a oggi conosciute 4 classi di allergeni della mela (*Mal d 1*, *Mal d 2*, *Mal d 3* e *Mal d 4*) la cui funzione, però, nell'albero, sembra principalmente quella di difesa contro i patogeni (Mills et al., 2003). Le proteine codificate da questi geni si accumulano nella buccia e nella polpa del frutto in modo diverso nelle singole varietà (Marzban et al., 2005; fig. 12). Associando a ogni allergene un determinato potenziale allergenico sarà possibile dirigere il miglioramento genetico del melo verso l'ottenimento di varietà a bassa o senza allergenicità (qualora si escludano i relativi allergeni).

E) NUOVE STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO GENETICO

La conoscenza della base genetica che controlla i caratteri bio-agronomici dell'albero e quelli merceologici del frutto, le informazioni sui geni, la loro posizione nei genomi e l'attività nei processi metabolici delle piante, hanno aperto nuove strade all'innovazione e al miglioramento del nostro patrimonio arboreo, allargando la variabilità genetica. Le potenzialità delle biotecnologie agrarie sono state ampiamente preconizzate nel Rapporto EASAC (European Academy of Science Advisory Council 2006), avendo come fulcro la ricerca genomica e come recettore primario il miglioramento genetico delle pian-

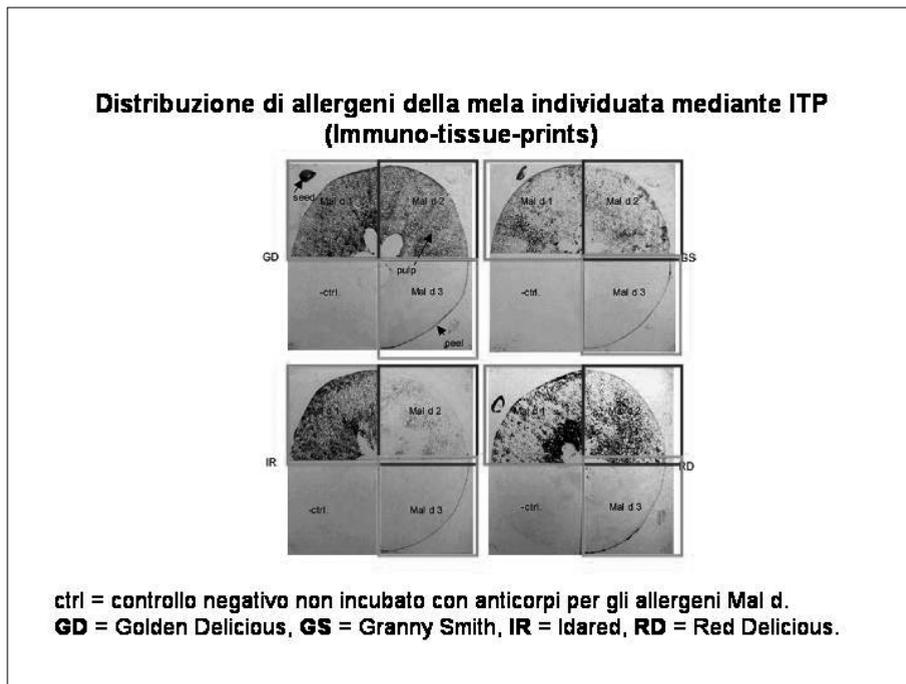


Fig. 12 Localizzazione degli allergeni Mal d 1, Mal d 2 e Mal d 3 nella polpa e nella buccia di mele (da Marzban et al., 2005)

te. In pratica i programmi di miglioramento genetico trarranno sempre più spunto da acquisizioni di conoscenze molecolari.

Con tale approccio si creeranno varietà adatte a sistemi agricoli sostenibili, per la riduzione del livello di sostanze inquinanti, per la salvaguardia dell'ambiente e per l'innalzamento della sicurezza alimentare, esaltando le caratteristiche qualitative del frutto e innalzando i costituenti nutraceutici funzionali (antiossidanti, tocoferoli, acido folico, aminoacidi essenziali, ecc.).

La caratterizzazione molecolare dei genomi delle varietà coltivate deve portare a una scelta mirata delle linee parentali nei programmi di breeding e a nuove vie nel processo selettivo, per abbreviarlo e renderlo meno oneroso. Fra le strategie molecolari di miglioramento genetico è importante ricordare la piramidizzazione dei geni di resistenza ovvero la possibilità di riunire in un unico genotipo più sorgenti di resistenza a un patogeno diminuendo la probabilità che quel patogeno evolvendosi superi la resistenza stessa. Un progetto di ricerca a livello europeo (il progetto EU-DARE) ha caratterizzato diverse sorgenti di resistenza a ticchiolatura del melo (monogeniche e poligeniche)

per sviluppare marcatori in grado di supportare programmi di breeding finalizzati a piramidizzare queste resistenze (Durel et al., 2004). Bisogna poi cercare di accrescere e accumulare resistenze a più patogeni nello stesso genotipo. Infine, non appena saranno sciolte le riserve procedurali e ideologiche, bisogna considerare l'ingegneria genetica fra le possibili risposte applicative per introdurre e ricombinare caratteri di grande utilità sociale ed economica, laddove i metodi riproduttivi tradizionali non lo consentano (Sansavini et al., 2004 e 2007).

Nell'intento di valorizzare la genomica vegetale come strumento basilare per sviluppare la ricerca e l'innovazione tecnica a supporto della filiera agro-alimentare è nata in Europa la piattaforma "Plants for the future", la quale svolgerà un ruolo importante nell'ambito dei progetti di ricerca del VII Programma Quadro della Comunità Europea. Fra gli scopi di questa iniziativa c'è la necessità di migliorare la sostenibilità e redditività della produzione primaria, rispettando il desiderio dei consumatori di avere a disposizione alimenti sani ad alto valore nutrizionale. Per ottenere questo risultato grazie alla genomica si possono caratterizzare i geni e i marcatori QTL che influenzano la resa delle colture e la qualità dei prodotti, tenendo in considerazione il relativo impatto con l'ambiente. Questo scopo può essere raggiunto con una attività mirata di breeding supportato dalle tecnologie qui illustrate, tutte impostate nel presupposto di una larga disponibilità di marcatori funzionali da aggregare alla MAS.

Il rapporto fra genomica e trascrittomica richiede però competenze diverse e integrate, dal biologo molecolare, al biochimico-fisiologo, al bioinformatico, al pomologo; tutti dovranno agire in stretto collegamento entro progetti comuni. Da un lato l'uso della tecnologia "microarray" sta producendo una grande quantità di dati, e quindi di marcatori funzionali, inimmaginabile solo pochi anni fa. La nascita anche in Italia di consorzi di sequenziamento di librerie EST (come ESTree) ha da tempo indicato l'opportunità di sviluppare approcci interdisciplinari e integrati. Altre tecniche di genetica inversa come il "tilling" si stanno affermando in altri modelli di studio come le specie cerealicole. Saranno utilizzabili in futuro anche in frutticoltura? Quali tecniche saranno più opportune per caratterizzare, plasmare e fissare i caratteri dei mutanti clonali nelle specie arboree?

Per dare risposte convincenti a queste domande occorrerà passare al sequenziamento dei genomi di singole varietà, quando si disporrà del genoma sequenziato della specie di riferimento. Si potranno analizzare in questo modo non solo le mutazioni a carico di geni ma anche quelle a carico dei relativi promotori. Per questo approccio di genomica classica sono già dispo-

nibili diverse tecniche (454, Solexa e Solid) a costi sempre più contenuti. Al convegno “Ultra-Fast Genomics”, che si è tenuto a Dubai nel dicembre 2007, l’attenzione si è concentrata proprio nelle ricadute pratiche di questo nuovo approccio genomico, per la conoscenza delle relazioni fra i geni di maggiore interesse in un singolo genoma. Le informazioni così ottenute dovranno perciò sempre più essere implementate con quelle di trascrittomica e proteomica per conoscere la funzione e la regolazione dei geni e per applicarla possibilmente al miglioramento genetico.

CONCLUSIONI

Le biotecnologie, nel campo delle piante arboree da frutto, sono un supporto indispensabile per andare verso sistemi di coltivazione sostenibili, per migliorare quali-quantitativamente le produzioni, per renderle più resistenti e adatte ai vari ambienti. Questi traguardi potranno essere conseguiti se, attraverso la biologia molecolare, saranno riviste le basi della fisiologia, della biochimica e dei processi metabolici, che sottendono le risposte difensive della pianta, i cicli di crescita vegetativi e riproduttivi, e la maturazione e conservazione del frutto. Tappe fondamentali per il raggiungimento di questi obiettivi sono l’individuazione e il sequenziamento dei geni e lo sviluppo di marcatori funzionali a essi associati. La genomica funzionale dà la possibilità di indirizzare i programmi di miglioramento genetico e di orientare il successivo processo selettivo.

La genetica quantitativa (sia con l’analisi QTL sia col “linkage disequilibrium”) sarà di ausilio per aumentare l’efficienza della MAS nella selezione dei caratteri poligenici, che sono la maggioranza di quelli che esprimono lo sviluppo e la produttività delle piante nonché il valore commerciale del frutto.

I genomi interamente sequenziati (per vite e a breve anche di melo, olivo e pesco) creano opportunità per esplorare l’intero genoma, per identificare la complessità dei geni al fine di operare una selezione più mirata nelle varie direzioni dei programmi di breeding.

RIASSUNTO

Le biotecnologie e in particolare la genomica, hanno avuto in Europa un rilevante sviluppo, forse anche per compensare la frenata delle ricerche sulle piante geneticamente modificate (OGM) decretata dagli organi legislativi. Recentemente la genomica italiana ha conseguito risultati di rilievo internazionale, come dimostra il sequenziamento del genoma di vite e melo.

Grazie alla genomica sono stati individuati numerosi geni, che sono stati sequenziati, clonati e mappati, divenendo un utile strumento per definire programmi di miglioramento genetico mirati a piante più resistenti ed efficienti e a frutti di migliore qualità, per sviluppare tecniche di propagazione e difesa ecocompatibili, per ridurre gli apporti idrici e nutrizionali. Conoscere la funzione dei singoli geni, le loro interazioni, i meccanismi di regolazione, le proteine da essi codificate e la loro espressione nei *pathway* metabolici della pianta significa il profilarsi di una nuova biologia dei sistemi produttivi per renderli più competitivi.

Attraverso il successivo approccio trascrittomico si possono identificare geni differenzialmente espressi, indotti da fattori ambientali e culturali e da questi derivare adattamenti agli interventi agronomici o introdurne di nuovi. Per far questo occorre attivare o reprimere geni per sviluppare resistenze a stress biotici provocati da patogeni (es. ticchiolatura, fireblight, sharka, ecc.) o a stress abiotici (siccità, salinità).

La biologia molecolare e la genomica stanno perciò favorendo una rivisitazione delle conoscenze genetiche, fisiologiche, biochimiche e agronomiche delle specie arboree coltivate, provocando, sul piano applicativo, innovazioni genetiche-varietali e tecniche di filiera, come mai era avvenuto in precedenza.

ABSTRACT

There have been notable advances in the application of molecular biology and genomics in Europe. Recent examples in Italy include the sequencing of the grapevine and apple genomes. The maps constructed from the sequenced and cloned genes represent a useful tool in plant breeding to get high quality fruit and more efficient plants, including such applications as eco-compatible methods of protection, propagation, soil and tree management aimed at reducing energy inputs. Efforts to gain greater insights into the function of individual and groups of genes, their interaction, regulatory mechanisms, the proteins they encode and their expression in a plant's metabolic pathways should lead to a revolution in our understanding of cropping biology and make tree and orchard productivity more efficient. Transcriptomics also can help us identify differentially expressed genes to improve fruit quality and its shelf life, to understand the role of environmental and management factors and, hence, to upgrade field practices or even develop innovations. The consequence step is how to apply this knowledge for activating and silencing several genes and therefore to induce resistance to biotic stress deriving from pathogens like scab, fireblight and sharka and to abiotic stress deriving from events like drought and salinity. Molecular tools like genomics are thus bringing about a new era in our understanding of the genetics, physiology and biochemistry of plant processes and should lead to advances in the breeding of new cultivars and reverberate through the fruit industry's supply chain.

LETTERATURA

BACHEM C.W.B., OOMEN R.J.F.J., VISSER R.G.F. (1998): *Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol*, «Plant Molecular Biology Reports», 16, pp. 157-173.

- BELFANTI E., DILWORTH E.S., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCHI L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004): *The Hcrvf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*, «PNAS», 101, pp. 886-890.
- BIANCHI V.J., VENTURI S., FACHINELLO J.C., TARTARINI S., SANSAVINI S. (2002): *I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino*. «Frutticoltura», 4, pp. 83-87.
- BROOHTHAERTS W., VERDOODT L., KEULEMANS J., JANSSENS G.A., BROEKAERT W.F. (1996): *The self-incompatibility gene in apple and determination of the S-genotype of apple cultivars by PCR*, «Acta Horticulturae», 423, pp. 103-109.
- BUSOV V., FLADUNG M., GROOVER A., STRAUSS S. (2005): *Insertional mutagenesis in Populus: relevance and feasibility*, «Tree Genetics and Genomes», 1, pp. 135-142.
- CALENGE F., DROUET D., DENANCÉ C., VAN DE WEG W.E., BRISSET M.N., PAULIN J.P., DUREL C.E. (2005): *Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies*, «Theoretical and Applied Genetics», 111, pp. 128-135.
- CHAGNÉ D., CARLISLE C.M., BLOND C., VOLZ R.K., WHITWORTH C.J., ORAGUZIE N.C., CROWHURST R.N., ALLAN A.C., ESLEY R.V., HELLENS R.P., GARDINER E. (2007): *Mapping a candidate gene (MDMYB10) for red flesh and foliage colour in apple*, «BMC GENOMICS», 8: 212 DOI: 10.1186/1471-2164-8-212.
- CONSOLANDI C., PALMIERI L., DOVERI S., MAESTRI E., MARMIROLI N., REALE S., LEE D., BALDONI L., TOSTI N., SEVERGNINI M., DE BELLIS G., CASTIGLIONI B. (2007): *Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format*, «Journal of Biotechnology», pp. 565-574.
- CONSOLANDI C., PALMIERI L., SEVERGNINI M., MAESTRI E., MARMIROLI N., AGRIMONTI C., BALDONI L., DONINI P., DE BELLIS G., CASTIGLIONI B. (2008): *A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, Multiplex PCR and LDR-Universal Array analysis*, «European Food Research Technology», 227, pp. 1429-1438.
- COSTA F., STELLA S., SANSAVINI S., VAN DE WEG W.E. (2005): *Functional markers as genetic approach to study ethylene production and fruit softening in apple (Malus x domestica Borkh.)*, «Acta Horticulturae», 682, pp. 389-394.
- COSTA F., VAN DE WEG W.E., STELLA S., DONDINI L., PRATESI D., MUSACCHI S. AND SANSAVINI S. (2008): *Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (Malus x domestica Borkh.) and pear (Pyrus communis)*, «Tree Genetics & Genomes», 3, pp. 575-586.
- DIRLEWANGER E., MOING A., ROTHAN C., SVANELLA L., PRONIER V., GUYE A., PLOMION C., MONET R. (1999): *Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (Prunus persica (L.) Batsch)*, «Theoretical and Applied Genetics», 98, pp. 18-31.
- DIRLEWANGER E., GRAZIANO E., JOOBEUR T., GARRIGA-CALDERE F., COSSON P., HOWAD W., ARUS P. (2004): *Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops*, «PNAS», 101, pp. 9891-9896.
- DIATCHENKO L., LAU Y.F.C., CAMPBELL A.P., CHENCHIK A., MOQADAM F., HUANG B., LUKYANOV S., LUKYANOV K., GURSKAYA N., SVERDLOV E.D., SIEBERT P.D. (1996): *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*, «PNAS», 93, pp. 6025-6030.
- DONDINI L., LAIN O., GEUNA F., BANFI R., GIAOTTI F., TARTARINI S., BASSI D., TESTOLIN R. (2006): *Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing Prunus maps*, «Tree Genetics & Genomes», 3, pp. 239-249.

- DONDINI L., COSTA F., PIERANTONI L., GAIOTTI F., CHIODINI R., TARTARINI S., SANSAVINI S. (2004a): *The RGA family: promising gene analog related to fireblight and sharka resistance*, «Acta Horticulturae», 663, pp. 161-166.
- DONDINI L., COSTA F., TATARANNI G., TARTARINI S., SANSAVINI S. (2004b): *Cloning of apricot RGA (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated to sharka (PPV) resistance*, «Journal of Horticultural Science and Biotechnology», 79, pp. 729-734.
- DONDINI L., PIERANTONI L., GAIOTTI F., CHIODINI R., TARTARINI S., BAZZI C., SANSAVINI S. (2004c): *Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (Pyrus communis L.) genetic linkage map*, «Molecular Breeding», 14, pp. 407-418.
- DUREL C.E., CALENGE F., PARISI L., VAN DE WEG W.E., KODDE L.P., LIEBHARD R., GESLER C., THIERMANN M., DUNEMANN F., GENNARI F., TARTARINI S., LESPINASSE Y. (2004): *An overview of the position and robustness of scab resistance QTLs and major genes by aligning genetic maps of five apple progenies*, «Acta Horticulturae», 663, pp. 135-140.
- ESPLEY R.V., HELLENS R.P., PUTTERILL J., STEVENSON D.E., KUTTY-AMMA S., ALLAN A.C., (2007): *Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10*, «The Plant Journal», 49, pp. 414-427.
- GESSLER C., PATOCCHI A., SANSAVINI S., TARTARINI S., GIANFRANCESCHI L. (2006): *Venturia inaequalis resistance in apple*, «Critical Review in Plant Science», 25, pp. 473-503.
- GOLDWAY M., TAKASAKI T., SANZOL J., ZISOVICH A., MOTA M., STERN R.A., AND SANSAVINI, S. (2008): *Renumbering the S-RNase alleles of European pear (Pyrus communis L.) and cloning the S-109 RNase allele*, «Scientia Horticulturae», doi:10.1016/j.scienta.2008.08.027.
- HILL W.G., ROBERTSON W.G. (1968): *Linkage disequilibrium in finite populations*, «TAG. Theoretical and Applied Genetics», 38, pp. 226-231.
- HURTADO M.A., ROMERO C., VILANOVA S., ABBOTT A.G., LLACER G., BADENES M.L. (2002): *Genetic linkage map of two apricot cultivars (Prunus armeniaca L.) and mapping of PPV (sharka) resistance*, «Theoretical and Applied Genetics», 105, pp. 182-191.
- IKEDA K., IGIC B., USHIJIMA K., YAMANE H., HAUCK N.R., NAKANO R., SASSA H., IEZONI A.F., KOHN J.R., TAO R. (2004): *Primary structural features of the S haplotype specific F-box protein, SFB, in Prunus*, «Sexual Plant Reproduction», 16, pp. 235-243.
- ISHIMIZU T., INOUE K., SHIMONAKA M., SAITO T., TERAI O., NORIOKA S. (1999): *PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars*, «Theoretical and Applied Genetics», 98, pp. 961-967.
- JACKSON S., ROUNSLEY S., PURUGGANAN M. (2006): *Comparative sequencing of plant genomes: choices to make*, «The Plant Cell», 18, pp. 1100-1104.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B., POLICRITI A., CLEPET C., CASAGRANDE A., CHOISNE N., AUBOURG S., VITULO N., JUBIN C., VEZZI A., LEGEAI F., HUGUENEY P., DASILVA C., HORNER D., MICA E., JUBLOT D., POULAIN J., BRUYÈRE C., BILLAULT A., SEGURENS B., GOUYVENOUX M., UGARTE E., CATTONARO F., ANTHOUARD V., VICO V., DEL FABBRO C., ALAUX M., DI GASPERO G., DUMAS V., FELICE N., PAILLARD S., JUMAN I., MOROLDO M., SCALABRIN S., CANAGUIER A., LE CLAINCHE I., MALACRIDA G., DURAND E., PESOLE G., LAUCOU V., CHATELET P., MERDINOGLU D., DELLEDONNE M., PEZZOTTI M., LECHARNY A., SCARPELLI C., ARTIGUENAVE F., PÈ M.E., VALLE G., MORGANTE M., CABOCHE M., ADAM-BLONDON A.F., WEISSENBACH J., QUÉTIER F., WINCKER P. (2007): *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*, «Nature», 449, pp. 463-467.

- JOUBEUR T., VIRUEL M.A., DE VICENTE M.C., JAUREGUI B., BALLESTER J., DETTORI M.T., VERDE I., TRUCO M.J., MESSEGUER R., BATTLE I., QUARTA R., DIRLEWANGER E., ARÚS P. (1998): *Construction of a saturated linkage map for Prunus using an almond x peach F2 progeny*, «Theoretical and Applied Genetics», 97, pp. 1034-1041.
- JOUBEUR T., PERIAM N., DE VICENTE M.C., KING G.J., ARUS P. (2000): *Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers*, «Genome», 43, pp. 649-655.
- KENIS K., KEULEMANS J. (2005): *Genetic linkage maps of two apple cultivars (Malus x domestica Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers*, «Molecular Breeding», 15, pp. 205-219.
- KHAN M.A., DUFFY B., GESSLER C., PATOCCHI A. (2006): *QTL mapping of fire blight resistance in apple*, «Molecular Breeding», 17, pp. 299-306.
- KHAN M.A., DUFFY B., DUREL C.-E., DENANCÉ C., KELLERHALS M., PATOCCHI A., GESSLER C. (2007): *Development of markers linked to the 'Fiesta' 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection*, «Genome», 50, pp. 568-577.
- KING G.J., MALIEPAARD C., LYNN J.R., ALSTON F.H., DUREL C.E., EVANS K.M., GRIFON B., LAURENS F., MANGANARIS A.G., SCHREVEN S., TARTARINI S., VERHAEGH J. (2000): *Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (Malus pumila Mill.)*, «Theoretical and Applied Genetics», 100, pp. 1074-1084.
- KOBAYASHI S., YAMAMOTO N.G., HIROCHIKA H. (2004): *Retrotransposon-Induced mutations in grape skin colour*, «Science», 304, pp. 967-982.
- KOOPMAN W.M., LI Y., COART E., VAN DE WEG E., VOSMAN B., ROLDÁN-RUIZ I., SMULDERS M.J.M. (2007): *Linked vs. unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression*, «Molecular Ecology», 16, pp. 243-256.
- LAMBERT P., HAGEN L.S., ARUS P., AUDERGON J.M. (2004): *Genetic linkage maps of two apricot cultivars (Prunus armeniaca L.) compared with the almond Texas x peach Earlygold reference map for Prunus*, «Theoretical and Applied Genetics», 108, pp. 1120-1130.
- LIJAVETZKY K., CABEZAS J.A., IBÁÑEZ A., RODRÍGUEZ V., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. (2007): *High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (Vitis vinifera L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology*, «Genomics», 8, pp. 424-435.
- LIANG P., PARDEE A.B. (1992): *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*, «Science», 257, pp. 967-971.
- LIEBHARD R., GIANFRANCESCO L., KOLLER B., RYDER C.D., TARCHINI R., VAN DE WEG E., GESSLER C. (2002): *Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (Malus x domestica Borkh.)*, «Molecular Breeding», 10, pp. 217-241.
- LIEBHARD R., KELLERHALS M., PFAMMATTER W., JERTMINI M., GESSLER C. (2003): *Mapping quantitative physiological traits in apple (Malus x domestica Borkh.)*, «Plant Molecular Biology», 52, pp. 511-526.
- MALIEPAARD C., ALSTON F.H., VAN ARKEL G., BROWN L.M., CHEVREAU E., DUNEMANN F., EVANS K.M., GARDINER S., GUILFORD P., VAN HEUSDEN A.W., JANSE J., LAURENS F., LYNN J.R., MANGANARIS A.G., DEN NIJS A.P.M., PERIAM N., RIKKERINK E., ROCHE P., RYDER C., SANSAVINI S., SCHMIDT H., TARTARINI S., VERHAEGH J.J., VRIELINK-VAN GINKEL M., KING G.J. (1998): *Aligning male and female linkage maps of apple using multi-allelic markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 97, pp. 60-63.

- MARZBAN G., PUEHRINGER H., DEY R., BRYNDA S., MA Y., MARTINELLI A., ZACCARINI M., VAN DER WEG E., HOUSLEY Z., KOLARICH D., ALTMANN F., LAIMER M. (2005): *Localization and distribution of the major allergens in apple fruits*, «Plant Science», 169, pp. 387-394.
- MILLS E.N.C., MADSEN C., SHEWRY P.R., WICHERS H.J. (2003): *Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships*, «Trends in Food Science & Technology», 14, pp. 145-156.
- MORGANTE M., SALAMINI F. (2003): *From plant genomics to breeding practice*, «Current Opinions in Biotechnology», 14, pp. 214-219.
- NORELLI J.L., FARRELL R.E., BASSETT C.L., BALDO A.M., LALLI D., ALDWINCKLE H.S., WISNIEWSKI M.E. (2008): *Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis*, «Tree Genetics & Genomes», doi: 0.1007/s11295-008-0164-y.
- PARIS R. (2006): *Geni di melo differenzialmente espressi dopo infezione di Venturia inaequalis*, in «Tesi di Dottorato in Biotecnologie Cellulari e Molecolari», Università di Bologna 01/06/2006.
- PARIS R., COVA V., PAGLIARANI G., TARTARINI S., KOMJANC M., SANSAVINI S. (2008): *Expression profiling in HcrVf2-transformed apple plants in response to Venturia inaequalis*, «Tree Genetics & Genomes», doi 10.1007/s11295-008-0177-6.
- PÉ M.E. (2008): *Lo studio del genoma sta cambiando la frutticoltura*, «Informatore Agrario», 10, pp. 66-68.
- PIERANTONI L., CHO K-H., SHIN I-S., CHIODINI R., TARTARINI S., DONDINI L., KANG S-J., SANSAVINI S. (2004): *Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations*, «Theoretical and Applied Genetics», 109, pp. 1519-1524.
- PIERANTONI L., DONDINI L., CHO K-H., SHIN I-S., GENNARI F., CHIODINI R., TARTARINI S., KANG S-J., SANSAVINI S. (2007): *Pear scab resistance QTLs via a European pear (Pyrus communis) linkage map*, «Tree Genetics & Genomes», 4, pp. 311-317.
- QUILLOT B., WU B.H., KERVILLA J., GENARD M., FOULONGNE M., MOREAU K. (2004): *QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between Prunus persica cultivars and the wild relative species P. davidiana*, «Theoretical and Applied Genetics», 109, pp. 884-897.
- RESKY R. (1998): *Physcomitrella and Arabidopsis: the David and Goliath of reverse genetics*, «Trends in Plant Science», 3, pp. 209-210.
- ROMERO C., VILANOVA S., BURGOS L., MARTINEZ-CALVO J., VICENTE M., LLACER G., BADENES M.L. (2004): *Analysis of the S-locus structure in Prunus armeniaca L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes*, «Plant Molecular Biology», 56, pp. 145-157.
- SALIENTIJN E.M.J., AHARONI A., SCHAART J.G., BOONE M.J., KRENS F.A. (2003): *Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness*, «Physiologia Plantarum», 118, pp. 571-578.
- SANSAVINI S., BARBIERI M., BELFANTI E., TARTARINI S., VINATZER B., GESSLER C., SILFVERBERG E., GIANFRANCESCHI L., HERMANN D., PATOCCHI A. (2004): *Trasformazione genetica del melo Gala con un gene di resistenza a ticchiolatura*, «Riv. di Frutticoltura», 1, pp. 54-58.
- SANSAVINI S., BELFANTI E., COSTA F., DONATI F. (2005): *European apple breeding programs turn to biotechnology*, «Chronica Horticulturae», ISHS, Leuven, 2, pp. 16-19.
- SANSAVINI S., GAMBERINI A., BASSI D. (2006): *Peach breeding, genetics and new culti-*

- var trends*, ISHS VI Peach Symp., Santiago (Chile), «Acta Horticulturae», 713, pp. 23-48.
- SANSAVINI S., BASSI D., TESTOLIN R. (2007): *Miglioramento genetico e ricerca biotecnologica per il rinnovamento varietale*, in *Nuove frontiere dell'arboricoltura italiana*, a cura di S. Sansavini, Alberto Perdisa Editore, Bologna, pp. 303-338.
- SANSAVINI S. (2008): *Miglioramento genetico*, in *Il melo*, Bayer Cropscience s.r.l., Milano, pp. 340-377.
- SARGENT D J., MARCHESE A., SIMPSON D.W., HOWAD W., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ F., MONFORT A., ARÚS P., EVANS K.M., TOBUTT K.R. (2008): *Development of "universal" gene-specific markers from Malus spp. cDNA sequences, their mapping and use in synteny studies within Rosaceae*, «Tree Genetics & Genomes», doi 10.1007/s11295-008-0178-5.
- SASSA H., KAKUI H., MIYAMOTO M., SUZUKI Y., HANADA T., USHIJIMA K., KUSABA M., HIRANO H., Koba T. (2007): *S Locus F-Box Brothers: multiple and pollen-specific F-Box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and japanese pear*, «Genetics», 175, pp. 1869-1881.
- SCHAFFER R.J., FRIEL E.N., SOULEYRE E.J.F., BOLITHO K., THODEY K., LEDGER S., BOWEN J.H., MA J.-A., NAIN B., COHEN D., GLEAVE A.P., CROWHURST R.N., JANSSEN B.J., YAO J.-L., NEWCOMB R.D. (2007): *A Genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway*, «Plant Physiology», 144, pp. 1899-1912.
- SCHENA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995): *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*, «Science», 270, pp. 467-470.
- TAKOS A.M., UBI B.E., ROBINSON S.P., WALKER A.R. (2006): *Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin*, «Plant Science», 170, pp. 487-499.
- TARTARINI S (1996): *RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple*, «Theoretical and Applied Genetics», 92, pp. 803-810.
- TARTARINI S., GIANFRANCESCO L., SANSAVINI S., GESSLER C (1999): *Development of reliable PCR markers for the selection of the Vf gene conferring scab resistance in apple*, «Plant Breeding», 118, pp. 183-186.
- TARTARINI S., SANSAVINI S. (2003): *The use of molecular markers in pome fruit breeding*, «Acta Horticulturae», 622, pp. 129-140.
- TERRIER N., GLISSANT D., GRIMPLET J., BARRIEU F., ABAL P., COUTURE C., AGEORGES A., ATANASSOVA R., LÉON C., RENAUDIN J.P., DÉDALDÉCHAMP F, ROMIEU C., DELROT S., HAMDI S. (2005): *Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (Vitis vinifera L.) development*, «Planta», 222, pp. 832-847.
- TRAINOTTI L., BONGHI C., ZILLOTTO F., ZANINA D., RASORI A., CASADORO G., RAMINA A. AND TONUTTI P. (2006): *The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach fruit*, «Plant Science», 170, pp. 606-613.
- TRAINOTTI L., TADIELLO A., CASADORO G. (2007): *The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches*, «Journal of Experimental Botany», 58, pp. 3299-3308.
- USHIJIMA K., SASSA H., DANDEKAR A.M., GRADZIEL T.M., TAO R., HIRANO H. (2003): *Structural and transcriptional analysis of the Self-Incompatibility Locus of almond: identi-*

- fication of a pollen-expressed F-Box gene with haplotype-specific polymorphism*, «The Plant Cell», 15, pp. 771-781.
- VAN DE WEG W.E., VOORRIJS R.E., FINKERS R., KODDE L.P., JANSEN J., BINK M.C.A.M. (2004): *Pedigree genotyping: a new pedigree-based approach of QTL identification and allele mining*, «Acta Horticulturae», 663, pp. 45-50.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A., PRUSS D., PINDO M., FITZGERALD F.M., VEZZULLI S., REID J., MALACARNE G., ILIEV D., COPPOLA G., WARDELL B., MICHELETTI D., MACALMA T., FACCI M., MITCHELL J.T., PERAZZOLLI M., ELDRIDGE G., GATTO P., OYZERSKI R., MORETTO M., GUTIN N., STEFANINI M., CHEN Y., SEGALA C., DAVENPORT C., DEMATTÈ L., MRAZ A., BATTILANA Y., STORMO K., COSTA F., TAO Q., SI-AMMOUR A., HARKINS T., LACKEY A., PERBOST C., TAILLON B., STELLA A., SOLOVYEV V., FAWCETT J.A., STERCK L., VANDEPOELE K., GRANDO S.M., TOPPO S., MOSER C., LANCHBURY J., BOGDEN R., SKOLNICK M., SGARAMELLA V., BHATNAGAR S.K., FONTANA P., GUTIN A., VAN DE PEER Y., SALAMINI F., VIOLA R. (2007): *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*, «PLoS ONE», 2, e1326, doi:10.1371/journal.pone.0001326.
- VELASCO R. (2008): *Sequenziato il genoma della vite Pinot Nero*, «Riv. di Frutticoltura», 12, in stampa.
- VENTURI S., BIANCHI V., SANSAVINI S. (2002): *Aggiornamento delle tecniche di fingerprinting: AFLP ed altri marcatori ad alta potenzialità polimorfica*, «Italus Hortus», 9, pp. 93-94.
- VENTURI S., DE FRANCESCHI P., DONDINI L., SANSAVINI S.: *Retrotransposon based markers to discriminate sports in pear*, in International Symposium Eucarpia, Zaragoza 16-20 settembre 2007, «Acta Horticulturae», in press.
- VENTURI S., DONDINI L., DONINI P., SANSAVINI S (2006): *Retrotransposon characterization and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 112, pp. 440-444.
- VERDE I., LAURIA M., DETTORI M.T., VENDRAMIN E., BALCONI C., MICALI S., WANG Y., MARRAZZO M.T., CIPRIANI G., HARTINGS H., TESTOLIN R., ABBOTT A.G., MOTO M., QUARTA R. (2005): *Microsatellite and AFLP markers in the Prunus persica [L. (Batsch)] x P. ferganensis BC₁ linkage map: saturation and coverage improvement*, «Theoretical and Applied Genetics», 111, pp. 1013-1021.
- VINATZER B.A., PATOCCHI A., GIANFRANCESCHI L., TARTARINI S., ZHANG H.B., GESSLER C., SANSAVINI S. (2001): *Apple contains receptor-like genes homologous to the Cladosporium fulvum resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 14, pp. 508-515.
- VINATZER B.A., PATOCCHI A., TARTARINI S., GIANFRANCESCHI L., SANSAVINI S. AND GESSLER C. (2004): *Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in Malus germplasm*, «Plant Breeding», 123, pp. 321-326.
- VILANOVA S., ROMERO C., ABBOTT A.G., LLACER G., BADENES M.L. (2003): *An apricot (Prunus armeniaca L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits*, «Theoretical and Applied Genetics», 107, pp. 239-247.
- YAMAMOTO T., KIMURA T., SAWAMURA Y., KOTOBUKI K., BAN Y., HAYASHI T., MATSUTA N. (2001): *SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear*, «Theoretical and Applied Genetics», 102, pp. 865-870.
- YAMAMOTO T., KIMURA T., SHODA M., IMAI T., SAITO T., SAWAMURA Y., KOTOBUKI K.,

- HAYASHI T., MATSUTA N. (2002): *Genetic linkage maps constructed by using an inter-specific cross between Japanese and European pears*, «Theoretical and Applied Genetics», 106, pp. 1-18.
- YOSHIDA K.T., NAITO S., TAKEDA G. (1994): *cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers*, «Plant Cell Physiology», 35, pp. 1003-1009.
- WANG D., KARLE R., BRETTIN T.S., IEZZONI A.F. (1998): *Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 97, pp. 1217-1224.
- WANG D., KARLE R., IEZZONI A.F. (2000): *QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry*, «Theoretical and Applied Genetics», 100, pp. 535-544.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOThAERTS W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSAVINI S. (2002): *S-allele characterization in self-incompatible pear (Pyrus communis L.)*, «Sexual Plant Reproduction», 15, pp. 153-158.

DAVIDE GUERRA*, ALESSANDRO TONDELLI*, CHIARA BISELLI*,
ANTONIO MICHELE STANCA**

Analisi del genoma delle piante coltivate per l'adattamento all'ambiente colturale

INTRODUZIONE

Il cambiamento del clima e le sue conseguenze stanno emergendo come una delle principali sfide con cui il genere umano dovrà confrontarsi nel prossimo futuro, un argomento ormai al centro del dibattito internazionale, sia in sede politica che scientifica. Variazioni anomale delle temperature e delle precipitazioni e la sempre maggiore frequenza e intensità di siccità da una parte e di inondazioni dall'altra, avranno implicazioni di lungo periodo sulla capacità produttiva, se non sull'esistenza stessa, degli agro-ecosistemi del pianeta (www.fao.org/climatechange). L'agricoltura è infatti il settore che più risente di questi cambiamenti, e sarà sempre più vulnerabile in futuro, specialmente in settori marginali di agricoltura di sussistenza, delle regioni semiaride e subumide. Pertanto, l'incremento delle produzioni agricole insieme alla stabilità di produzione e la qualità dei prodotti rappresentano l'obiettivo cruciale per l'economia e la sicurezza alimentare di tutti i paesi.

Nel complesso le riduzioni quali-quantitative delle produzioni causate da avverse condizioni dell'ambiente colturale sono ingenti, tanto che si stima che soltanto il 10% della superficie coltivata nel mondo può essere classificata nella categoria "non stress" (crescita in condizioni ambientali ottimali), mentre il restante 90% può essere soggetta a stress singoli o combinazione di stress, con diversa intensità, che limitano l'estrinsecazione del potenziale genetico della pianta (Cattivelli et al., 2008). Levitt (1980) ha distinto gli stress biotici (determinati da organismi viventi in grado di infettare o competere con la

* C.R.A.- Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale, Fiorenzuola d'Arda (PC)
• Università di Modena e Reggio Emilia

pianta) da quelli abiotici (dovuti a fattori chimici e fisici). Fra questi ultimi si collocano gli stress da alta o bassa temperatura, da carenza o eccesso di acqua, da radiazioni (infrarosse, IR; visibili, VIS; ultraviolette, UV; ionizzanti), da sali (principalmente sodio), da carenze o eccesso di nutrienti, da inquinanti organici e fitofarmaci, da metalli pesanti, da vento e da luce (alta o bassa intensità, fotoperiodo non corretto). I danni arrecati dall'agente stressante alla pianta possono essere diretti o indiretti, primari o secondari. Ad esempio, un danno diretto primario è quello subito da una pianta sottoposta a un rapido congelamento che provoca in pochissimo tempo la formazione di cristalli di ghiaccio nelle cellule e la loro morte. Allo stesso modo le elevate temperature portano per sé danno alla pianta (stress primario) ma, potendo causare collateramente carenza idrica, possono indurre ulteriori danni (stress secondario).

LA RISPOSTA DELLE PIANTE AGLI STRESS ABIOTICI

Come può una pianta adattarsi a condizioni ambientali avverse? A livello di "crop" l'adattamento è stato interpretato come la capacità di raggiungere elevati livelli di produzione anche in situazioni sfavorevoli. Selezionando per elevate produzioni, i breeders hanno indirettamente incrementato anche il rendimento in condizioni limitanti, per cui le varietà moderne, dotate di elevata potenzialità produttiva, spesso si comportano meglio rispetto a varietà antiche o accessioni locali direttamente selezionate in tali ambienti (Rizza et al., 2004).

A livello fisiologico, la resistenza di una pianta allo stress viene invece intesa come la sua capacità di sopravvivere, crescere e generare progenie in presenza del fattore sfavorevole (Levitt, 1980). Essa può essere ottenuta mediante tre differenti strategie così definite:

- *stress escape* (evitare l'avversità). In realtà si è di fronte a una forma di falsa resistenza: la pianta ha un ciclo di sviluppo che la porta a non intercettare l'avversità o a intercettarla in fasi fenologiche non a rischio. È questo il caso delle varietà precoci di frumento duro e di orzo che sfuggono la stretta da caldo nell'Italia meridionale;
- *stress avoidance* (evitare lo stress). Caratteristico di quelle piante che possiedono barriere stabili morfologiche e/o funzionali che consentono di prevenire o ridurre lo stress prodotto dall'avversità. Ad esempio, in caso di stress anossico, alcuni meccanismi consentono il trasferimento dell'ossigeno dalle parti ben aerate della pianta verso quelle che ne hanno a disposizione in quantità sub-ottimale;

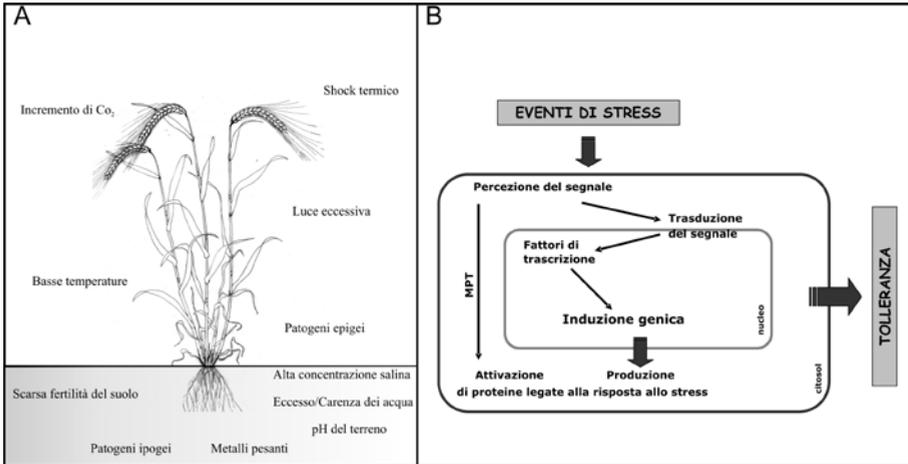


Fig. 1 A) Nell'ambiente culturale le piante sono spesso soggette a vari eventi stressanti di natura differente e con siti di azione specifici, pertanto alcuni stress agiranno sulla parte epigea (emersa) della pianta, altri su quella ipogea (apparato radicale); B) Al verificarsi di un evento di stress, la pianta attiva a livello cellulare una serie di meccanismi per far fronte a tale avversità (MPT= modificazioni post-traduzionali)

- *stress tolerance* (tollerare lo stress). Le piante sono in grado di attivare meccanismi fisiologici/molecolari in grado di alleviare gli effetti dovuti allo stress e/o riparare i danni subiti. Dato l'elevato numero di caratteri fisiologici implicati nella tolleranza, è probabile che non esista un unico pattern di risposta ma, al contrario, specie diverse possono raggiungere simili livelli di tolleranza utilizzando differenti meccanismi.

A livello cellulare, infatti, le piante hanno un complesso sistema di percezione e risposta agli stress che può essere schematizzato in quattro fasi distinte (fig. 1):

- *percezione del segnale*. Il fatto che le piante attivino una serie di processi molecolari in risposta alle variazioni ambientali implica necessariamente l'esistenza di recettori, situati sulla membrana plasmatica delle cellule, che agiscono da sensori rilevando tali cambiamenti. Alcuni studi suggeriscono ad esempio un ruolo centrale della fluidità delle membrane nella percezione di alte e basse temperature;
- *attivazione di messaggeri secondari per la trasduzione del segnale*. Ormoni come l'acido abscissico (ABA), ioni come Ca^{2+} , proteine MAPK (Mitogen-activated protein Kinase) e altre molecole partecipano a una serie di eventi che, come una vera e propria cascata, trasportano il segnale di stress fino al nucleo, dove viene attivata la trascrizione di geni di risposta;

- *attivazione di proteine regolatrici della trascrizione.* I fattori trascrizionali, piccole proteine in grado di legare il DNA in regioni specifiche dei promotori e di regolare la trascrizione di molti geni, rappresentano l'ultimo anello della catena di trasduzione del segnale: essi inducono l'espressione dei geni effettori della risposta allo stress. A questo livello la regolazione si fa più fine, cosicché per ogni condizione ambientale affrontata sarà possibile avere una risposta specifica e adeguata. L'analisi funzionale di questi fattori di trascrizione dovrebbe chiarire la complessa rete di regolazione dell'espressione di molti geni, responsabile dell'adattamento delle piante all'ambiente;
- *espressione di proteine legate alla risposta.* Differenti tipologie di proteine possono essere sintetizzate, a seconda del tipo di stress cui la pianta è sottoposta. In risposta a condizioni di siccità, basse temperature o alte concentrazioni saline, fenomeni riconducibili alla disidratazione cellulare, si ha ad esempio l'espressione di geni che consentono l'accumulo di osmoliti quali prolina, poliammine, glicina betaina, zuccheri e di ioni come il potassio o il sodio, tutti utili per contrastare la perdita di acqua.

Lo studio della tolleranza agli stress abiotici e biotici e la conoscenza dei processi fisiologici e molecolari responsabili della risposta della pianta a tali stress, rappresenta una premessa fondamentale per lo sviluppo di nuovi genotipi altamente produttivi anche in condizioni limitanti.

ANALISI GENETICA DELLA TOLLERANZA AGLI STRESS ABIOTICI

Lo strumento più antico per analizzare il genoma è senz'altro quello della mappatura classica per associazione, elaborato all'inizio del secolo scorso da T.H. Morgan, nei suoi lavori classici su *Drosophila melanogaster*. A partire dagli anni '80, lo sviluppo di diverse classi di marcatori molecolari del DNA ha consentito lo studio della struttura genetica di popolazioni e della loro variabilità, nonché la creazione di mappe genetiche altamente saturate e la mappatura di importanti caratteri agronomici (Pecchioni et al., 1993; Donini et al., 2001). La maggior parte di questi caratteri, come la produzione, la qualità, ma anche la resistenza a stress di tipo abiotico e biotico, presentano una variazione di tipo quantitativo, derivante dall'azione combinata di più geni e dall'interazione con fattori ambientali. Attraverso l'analisi molecolare è possibile oggi scomporre questi geni complessi in singoli fattori semplici responsabili di una quota più o meno grande della variabilità presente nella popolazione per il carattere og-

getto di studio (QTL: Quantitative Trait Locus). Disponendo di popolazioni segreganti per il fenotipo in studio e di mappe di linkage sviluppate a partire dalle stesse popolazioni è possibile identificare, mediante un'analisi QTL, i geni parzialmente coinvolti nella determinazione del carattere stesso. In questo modo è stato possibile ad esempio evidenziare il ruolo determinante del cromosoma omeologo 5H delle *Triticeae* nel controllo dell'adattamento all'ambiente e della risposta a stress abiotici quali freddo, siccità e alte concentrazioni saline (Cattivelli et al., 2002). In orzo due QTL con effetto additivo, associati con la capacità di sopravvivenza della pianta alle basse temperature, sono stati mappati sul cromosoma 5H nell'incrocio delle varietà 'Nuré' x 'Tremois' (Francia et al., 2004). Il primo locus (denominato *Fr-H2*) si sovrappone a un altro QTL per l'accumulo della proteina regolata da freddo COR14b (COLD REGULATED 14b), mentre il secondo locus (*Fr-H1*) sembra coincidere con il locus per la richiesta di vernalizzazione *Vrn-H1*.

Una delle sfide del futuro nel campo dell'analisi genetica dell'adattamento delle piante all'ambiente è comprendere le relazioni esistenti tra questi QTL e l'espressione di geni di risposta agli stress. Il clonaggio basato sulla posizione di mappa (o clonaggio posizionale) è ormai diventata una tecnica di routine nell'identificazione di geni responsabili di QTL, grazie al fatto che il loro effetto sul fenotipo può essere seguito in popolazioni segreganti per varianti alleliche alternative al gene stesso. Il maggior limite nell'applicazione di questo approccio in diverse specie di interesse agronomico (cereali *in primis*) consiste nella disponibilità e nella creazione di idonei strumenti di indagine (ad esempio mappe molecolari densamente saturate, librerie contenenti larghi inserti di DNA genomico), nonché nella natura fisica stessa del gene target (quantità di DNA ripetuto nell'intorno genomico, frequenza di ricombinazione nella regione genomica di interesse). Ciononostante, geni chiave per l'adattamento di orzo e frumento all'ambiente culturale sono stati isolati e caratterizzati seguendo questo approccio: tra questi ricordiamo i loci che controllano la risposta alla vernalizzazione e al fotoperiodo (*vrn* e *ppd* genes; Cockram et al., 2007) e il gene *mlo*, responsabile della resistenza dell'orzo a *Blumeria graminis* (Piffanelli et al., 2004).

La notevole quantità di dati di sequenza accumulati negli ultimi anni, unitamente agli studi di genomica funzionale su molte specie di piante di interesse agrario, permettono oggi di generare marcatori derivati da polimorfismi di singolo nucleotide (SNP: Single Nucleotide Polimorfism) entro geni candidati, ossia geni noti per avere ruoli di primo piano nei caratteri oggetto di studio. Questi polimorfismi potrebbero perciò essere direttamente coin-

volti nella variazione osservata a livello fenotipico. Nell'approccio per geni candidati solitamente si distinguono geni candidati "posizionali" e "funzionali". Un gene candidato viene considerato "posizionale" quando si trova in una regione del genoma che comprende un QTL di interesse. La disponibilità di mappe molecolari di linkage basate su marcatori sviluppati su sequenze geniche è un prerequisito fondamentale per l'identificazione di tali candidati posizionali. Solamente quando si osserva cosegregazione fra un QTL e un gene candidato, si può infatti ipotizzare una relazione causale tra alleli differenti del gene candidato e l'effetto del QTL stesso.

Un cluster di geni codificanti per fattori di trascrizione CBF, proteine coinvolte nelle fasi precoci della risposta alle basse temperature in diverse specie vegetali, coincide ad esempio con il già citato locus *Fr-H2* di resistenza al freddo identificato sulla mappa molecolare 'Nure' x 'Tremois' (Tondelli et al., 2006; Francia et al., 2007). In seguito alla loro attivazione, questi fattori di trascrizione si legano a elementi di riconoscimento presenti sulle regioni promotrici di geni direttamente coinvolti nella tolleranza al congelamento (ad esempio *cor14b*), la cui espressione viene così indotta.

Altre evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo predominante di differenti classi di fattori di trascrizione nella risposta delle piante agli stress abiotici. Chiaramente il vantaggio consiste nel fatto che queste proteine controllano solitamente molti geni strutturali e a volte prendono parte nella risposta a più stress simultaneamente (Tondelli et al., 2006). Applicare un programma di selezione assistita da marcatori molecolari allo scopo di piramidizzare il maggior numero possibile di tali fattori trascrizionali in un unico genotipo sarà la strategia vincente, in futuro, per ottenere varietà agronomicamente superiori.

Per geni candidati "funzionali" si intendono invece geni caratterizzati all'interno dei pathway biochimici e fisiologici che condizionano il carattere oggetto di studio. Le sequenze nucleotidiche di questi geni possono essere confrontate all'interno di un germoplasma costituito da linee genealogicamente non correlate, allo scopo di cercare associazioni statistiche tra polimorfismi nel gene candidato stesso e variazioni fenotipiche. Questa strategia di mappaggio di QTL per associazione (Association Mapping) utilizza collezioni di germoplasma sviluppatesi attraverso centinaia di generazioni di ricombinazione e selezione, ed è per questo più potente rispetto al classico mappaggio per linkage, che sfrutta popolazioni sperimentali create ad hoc. Ad esempio, 192 accessioni di orzo di diversa provenienza hanno permesso di identificare QTL per l'adattamento della coltura ad ambienti di tipo Mediterraneo (Co-

madran et al., 2007). In un analogo progetto finanziato dal consorzio ERANET Plant Genomics, denominato EXBARDIV (EXploitation of BARley DIVersity), verrà invece sviluppata per la prima volta una strategia di association mapping progressivo utilizzando marcatori SNP, al fine di scoprire nuovi alleli di geni utili nell'orzo ancestrale (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*) da sfruttare per il miglioramento genetico della specie coltivata. All'interno del progetto grande importanza è stata data a caratteri di resistenza a stress abiotici e biotici, da associare a polimorfismi identificati in circa 3000 geni espressi.

L'approccio per geni candidati rappresenta quindi un'utile alternativa ai metodi classici per clonare geni coinvolti nella risposta delle piante agli stress abiotici, soprattutto per specie con genomi di grandi dimensioni (de Vienne et al., 1999). Comunque, la cosegregazione su una mappa genetica o la correlazione statistica non dimostrano definitivamente una relazione causale tra il polimorfismo nel gene candidato e la variazione del carattere. Occorre pertanto effettuare ulteriori esperimenti per dimostrare il reale coinvolgimento del gene candidato, sfruttando la trasformazione genetica (complementazione di un fenotipo deficiente per il carattere di interesse) o l'analisi di mutanti (si veda il paragrafo successivo).

ANALISI FUNZIONALE DELLA TOLLERANZA AGLI STRESS – L'APPROCCIO "OMICO"

A partire dagli anni '80 si è avuto un crescente sviluppo di tecnologie e strumenti per lo studio dei meccanismi genetici e molecolari che stanno alla base della vita. La comparsa dei sequenziatori automatici ha permesso di avere accesso alla sequenza completa dei genomi di diverse specie viventi (tra cui *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* e prossimamente *Triticum aestivum* e *durum*), aprendo la strada alla comprensione globale della struttura e della funzione degli organismi, in quella che da molti viene definita l'era della post-genomica.

Il principale intento della biologia molecolare vegetale è ora quello di assegnare una funzione al crescente numero di geni predetti. In *Arabidopsis*, specie modello per la ricerca in ambito vegetale, circa il 55% dei geni può essere assegnato a una putativa funzione sulla base di similarità di sequenza, tuttavia a meno dell'8% di questi può essere attribuita una funzione per mezzo di evidenze sperimentali. Studi di tipo genetico, basati sullo sviluppo di mutanti in cui il gene oggetto di studio è deletato, o di tipo molecolare, finalizzati all'analisi dell'espressione del gene o alla localizzazione subcellulare

della proteina corrispondente, saranno fondamentali per comprendere come i pathway genetici e metabolici si siano evoluti per creare la biodiversità che ha permesso alle piante di riprodursi e colonizzare i diversi habitat, anche quelli più impervi. Tutti questi studi sono oggi facilitati dalla comparsa e integrazione delle scienze “omiche” (trascrittomica, proteomica e metabolomica), che permettono un’analisi comparata estesa a tutto il genoma, con lo scopo ultimo di acquisire quante più informazioni possibili e creare un network completo relativo alle innumerevoli funzioni cellulari.

Un contributo fondamentale allo studio dei genomi e all’identificazione della funzione genica è stato dato dall’analisi dell’attività trascrizionale dei geni espressi in determinate condizioni ambientali, stadi di crescita o altri fattori. Tradizionalmente questi studi prevedevano l’estrazione degli mRNA dai tessuti o organi di interesse, la loro immobilizzazione su membrane di nylon e la successiva ibridazione con sonde radioattive corrispondenti ai geni che si intendevano studiare (Northern blot). In questo modo sono stati caratterizzati, ad esempio, geni di riposta alle basse temperature nei cereali quali il già menzionato *cor14b* e il fattore di trascrizione *Hv-wrky38* (Crosatti et al., 1995; Marè et al., 2004). Questo approccio presenta tuttavia il limite di poter studiare uno o pochi geni per volta.

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecnologie che permettono l’analisi dell’attività genica a livello dell’intero genoma, ottenendo una misura quantitativa di ogni singolo gene per ogni tessuto, fase di crescita o trattamento. La tecnologia maggiormente sfruttata, quella del DNA microarray per lo studio dell’espressione genica, è basata sul legame fra sequenze nucleotidiche di RNA opportunamente marcate, derivanti dalla pianta oggetto di studio, e molecole di DNA immobilizzate su posizioni note di un supporto solido. In seguito all’ibridazione DNA/RNA, la concentrazione relativa delle sequenze di interesse può essere calcolata sulla base dell’intensità del segnale. In questo modo è possibile stabilire il livello di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, ottenendo una visione generale del trascrittoma dell’organismo in qualsiasi condizione o trattamento, al fine di identificare geni indotti o repressi rispetto a un controllo non trattato. I DNA microarray sono stati ad esempio sfruttati per lo studio dell’espressione genica di piante di riso e orzo esposte a diversi stress abiotici quali basse temperature, siccità, elevata salinità del terreno e applicazione di acido abscissico (ABA) esogeno (Matsui et al., 2008). In un analogo lavoro sono stati confrontati i profili trascrizionali di piante di frumento tenero e duro cresciute in differenti condizioni di stress idrico (Aprile et al., comunicazione personale). Il lavoro ha evidenziato che l’attivazione di risposte molecolari specifiche dipende sia da meccanismi con-

servati fra le due specie, ma altresì da porzioni cromosomiche presenti nella specie esaploide ma assenti nel frumento duro (tetraploide).

L'analisi del profilo di espressione di un gene può fornire una prima indicazione del suo ruolo all'interno della cellula; tale funzione viene solitamente confermata mediante lo studio di mutanti naturali o generati mediante opportune tecniche. L'analisi di mutanti può essere effettuata seguendo principalmente due vie, denominate "forward" e "reverse genetics". La prima prevede la creazione di popolazioni di mutanti mediante agenti mutageni chimici (come l'etilmetanosulfonato, EMS) o fisici (raggi-x) e la successiva selezione sulla base di un fenotipo di interesse, per poi risalire al gene mutato responsabile di quel fenotipo. Studiando mutanti ABA-deficient (*aba*) o ABA-insensitive (*abi*) di *Arabidopsis* è stato dimostrato che l'attivazione di alcuni geni indotti da stress (ad esempio *rd29A*) non necessita dell'accumulo di ABA endogeno quando la pianta è esposta a condizioni di freddo o di carenza idrica (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Lo svantaggio di un simile approccio sta nel fatto che per identificare il gene mutato è necessario procedere al clonaggio posizionale, tecnica che implica notevole dispendio di tempo e che quindi non è adatta per le analisi di genomica funzionale su larga scala.

In alternativa si può procedere con un approccio di "reverse genetics", che consiste nella selezione di genotipi mutanti per una data sequenza genica, al fine di identificare un fenotipo mutato. Essa si basa sulla possibilità di produrre mutazioni knock-out, detta anche perdita di funzione, tramite inserzione casuale di DNA esogeno (T-DNA tagging) o di elementi trasponibili all'interno di una pianta ospite per inattivare sequenze geniche. In questo modo sono state recentemente prodotte 225.000 linee di *Arabidopsis* T-DNA tagged, con una copertura pressoché totale del genoma; identici risultati sono stati ottenuti in riso.

Combinando differenti strategie di studio dei genomi è infine possibile ottenere informazioni molto più dettagliate. In un recente lavoro, Svensson et al. (2006) hanno ad esempio applicato l'analisi microarray allo studio di mutanti sottoposti a condizioni di stress da freddo. Confrontando il trascrittoma dei mutanti di orzo 'Albina' e 'Xantha', difettivi per lo sviluppo del cloroplasto, con quello di piante non mutate, sono state identificate due classi di geni indotti o repressi in risposta alle basse temperature. La prima è indipendente dal cloroplasto e annovera i sopracitati geni *CBF* e i loro target; l'altra è invece cloroplasto dipendente e suggerisce un ruolo fondamentale dell'organello nel controllo della risposta molecolare alle basse temperature.

Parallelamente all'analisi genomica, è in corso in molti laboratori lo

studio dettagliato del proteoma, ossia dell'intero corredo proteico presente in una cellula o in una sua frazione, nelle diverse fasi del ciclo vitale della pianta, o in seguito a diversi trattamenti cui la pianta viene sottoposta. Le proteine sono strutture dinamiche che si assemblano, si accumulano in compartimenti cellulari e traducono l'informazione biologica svolgendo la loro specifica attività. Tuttavia, è soprattutto come componenti di complessi macromolecolari che svolgono le loro funzioni cellulari. All'interno di una cellula infatti, spesso le proteine interagiscono tra loro assemblandosi in macromolecole complesse e dinamiche che svolgono funzioni critiche per la sopravvivenza della cellula, come la regolazione dei pathways metabolici, il controllo della replicazione del DNA, la trascrizione del DNA, la degradazione di enzimi e altre funzioni minori, ma altrettanto importanti.

Ne consegue che il proteoma risulta essere molto dinamico, in quanto la traduzione dei geni in proteine è regolata a seconda del tipo cellulare, della fase di sviluppo dell'organismo, delle interazioni abiotiche e biotiche con l'ambiente esterno. La concentrazione di una proteina non è ad esempio correlata in maniera semplice al livello di trascrizione del corrispondente gene, ma può essere regolata da eventi di splicing alternativo a carico dell'RNA, da modificazioni post-traduzionali quali fosforilazioni, glicosilazioni, processamento proteolitico, e da meccanismi che determinano la stabilità delle proteine come la sumoilazione (Mazucotelli et al., 2008). Infine l'associazione di più di due molecole in un complesso introduce livelli di organizzazione che vanno oltre l'interazione binaria.

Per comprendere completamente il funzionamento di un sistema complesso qual è la cellula, è quindi fondamentale catalogare tutte le proteine che ne fanno parte, ma anche identificare le interazioni che tra esse intercorrono. Gli obiettivi principali dell'analisi proteomica sono dunque:

- l'identificazione della popolazione proteica di un organismo, tessuto, cellula o compartimento subcellulare e la sua analisi comparativa con lo scopo di studiare una espressione proteica differenziale. La tecnica più ampiamente utilizzata, in particolar modo per le proteine solubili e le proteine di membrana esterne, è l'elettroforesi bidimensionale;
- l'identificazione di interazioni proteina-proteina e di complessi multiproteici: la marcatura di proteine (tagging) seguita da purificazione per affinità permette di identificare anche complessi multiproteici con basso livello di espressione;

- l'analisi delle modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazione, glicosilazione, processamento proteolitico e sumoilazione;
- la determinazione della struttura funzionale globale dei complessi multiproteici.

Per quanto riguarda lo studio dei processi di adattamento delle piante all'ambiente, l'interesse di una parte della comunità scientifica si sta spostando verso un livello superiore di regolazione: le modificazioni post-traduzionali, con particolare riguardo a ubiquitinazione e sumoilazione.

L'ubiquitinazione svolge un ruolo importante nel rimodellare il proteoma di una pianta in risposta a eventi di stress indirizzando verso la degradazione tutte le proteine che, a causa dello stress stesso, hanno subito un danno strutturale o che non sono più necessarie in quella determinata situazione. Il pathway di ubiquitinazione è articolato in tre passaggi principali che coinvolgono tre diversi enzimi: un enzima di attivazione E1, un enzima di coniugazione E2 e una ligasi E3. La E3 ligasi è la proteina che conferisce specificità e selettività al processo, in quanto riconosce specificamente proteine che recano una varietà di segnali di degradazione. Il genoma di *Arabidopsis* contiene almeno 1300 putative E3 ligasi mentre possiede solamente 2 isoforme dell'enzima E1 e 37 enzimi E2; una tale distribuzione riflette l'importanza che le E3 ligasi rivestono nel conferire specificità alla reazione di ubiquitinazione delle proteine (Mazzucotelli et al., 2008).

SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) è una proteina simile alla ubiquitina che viene attaccata post-traduzionalmente a una varietà di proteine target tra cui spiccano prevalentemente fattori trascrizionali. Nonostante lo schema di coniugazione della proteina SUMO sia molto simile a quello della ubiquitina, la sumoilazione delle proteine sembra non avere nessuna funzione di tipo proteolitico (Mazzucotelli et al., 2008).

Studi di proteomica condotti su differenti specie vegetali in seguito all'esposizione a stress di tipo abiotico e biotico hanno dimostrato che centinaia di trascritti e proteine correlate all'ubiquitinazione vengono modificate durante la risposta a tali stress, suggerendo un ruolo per l'ubiquitinazione nel determinare la tolleranza (Mazzucotelli et al., 2006). Tutto ciò è supportato da un recente lavoro di proteomica condotto sulle gemme fiorali di una linea di *Arabidopsis* recante una mutazione al gene *ASK1*, un componente critico del complesso di ubiquitinazione. Nel mutante *ask1* sono infatti stati identificati svariati target della ubiquitinazione, tra cui molte proteine correlate allo stress (Wang et al., 2006).

BASI GENETICO-MOLECOLARI DELLA RESISTENZA AGLI STRESS BIOTICI

Gli stress biotici sono determinati da varie categorie di patogeni fungini, batterici e virali che danneggiano fortemente la produttività delle coltivazioni sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo. Le piante sono in grado di difendersi mediante meccanismi di resistenza che possono essere distinti in due gruppi:

- sistema di difesa passivo, costituito dalle cosiddette “barriere” (ad esempio i rivestimenti cellulari);
- sistema di difesa attivo, ulteriormente suddiviso in sistema immunitario innato basale e sistema immunitario innato mediato dai geni di resistenza (geni R).

Il meccanismo di riconoscimento di alcune molecole prodotte dai patogeni (elicitori) determina l’attivazione del sistema immunitario basale delle piante, impedendo così un’ulteriore colonizzazione da parte di patogeni non compatibili e limitando la diffusione dei patogeni compatibili (Bittell e Robatzek, 2007). In questi casi la pianta riconosce delle molecole associate al patogeno mediante pattern specifici (MAMP: Microbe-Associated Molecular Patterns) e innesca un “signalling complesso” mediato da molecole come l’acido salicilico (SA: Salicylic Acid), ossido nitrico, intermedi reattivi dell’ossigeno (ROI: Reactive Oxygen Intermediates), acido jasmonico (JA: Jasmonic Acid) ed etilene. Qualora i patogeni compatibili riescano a evolvere la capacità di superare questa prima linea di difesa, producendo nell’apoplasto e/o nelle cellule ospiti molecole capaci di inibirla o interferire con essa, la pianta può innescare la resistenza dipendente dai geni R. Il riconoscimento di tali molecole del patogeno da parte dei prodotti dei geni R determina l’attivazione del secondo livello di resistenza, di solito mediato da una risposta ipersensibile (HR) che conduce alla morte cellulare a livello del sito di infezione.

L’identificazione e l’introggressione dei geni di resistenza nel germoplasma coltivato rappresenta un valido strumento per limitare le perdite produttive imputabili ai patogeni e l’uso di fitofarmaci in agricoltura, con indubbi vantaggi in termini economici e ambientali. Tuttavia l’ottenimento di una varietà resistente, utilizzando tecniche di breeding “convenzionale”, comporta un dispendio temporale ed economico rilevante. Introgredire un gene di resistenza all’interno del genoma di una linea coltivata con i metodi tradizionali, infatti, può richiedere più di 10-15 anni; inoltre sono necessari test lunghi e laboriosi per valutare il fenotipo resistente e per il mantenimento dei patogeni, soprattutto di quelli obbligati. L’efficacia della resistenza della pianta, poi, è sovente limitata nel tempo perché alcuni ceppi patogeni evolvono la capacità di supe-

rarla. Una possibile soluzione a questi problemi è costituita dall'impiego della selezione assistita da marcatori molecolari (MAS) per caratteri di resistenza o direttamente mediante trasformazione genetica.

I marcatori molecolari strettamente associati ai geni R eliminano la necessità di complesse analisi fenotipiche per identificare gli individui resistenti nelle prime generazioni delle popolazioni segreganti. In più, la MAS permette una più rapida risposta a un crollo della resistenza, una veloce introgressione di geni multipli derivanti da diversi germoplasmi attraverso il gene pyramiding e la selezione di rari ricombinanti tra geni di resistenza strettamente associati (Francia et al., 2005). Da queste considerazioni si può dedurre come una sempre maggiore comprensione delle basi genetico-fisiologiche della risposta delle piante ai patogeni, in particolare la conoscenza della sequenza dei geni R, rappresenti il presupposto fondamentale per superare i limiti attuali all'utilizzo di tali geni e per incrementare le potenzialità agronomiche.

L'oidio e la striatura bruna dell'orzo costituiscono esempi significativi di malattie che limitano fortemente la produttività. L'oidio è causato dal fungo parassita biotrofo obbligato *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Nelle colture di orzo sono stati introdotti molti geni di resistenza razza-specifici contro questa malattia, ma la maggior parte ha agito solo per breve tempo. La selezione all'interno delle popolazioni del fungo ha portato alla rapida diffusione di ceppi non riconosciuti dai geni di resistenza noti. Ad oggi l'unico esempio di resistenza durevole contro un patogeno è costituito dal gene *mlo* di orzo.

Il gene *mlo* fornisce un'importante fonte di difesa contro l'oidio conferendo una resistenza pre-austoriale completa verso tutti gli isolati del patogeno. Dal 1970 si è fatto un largo uso degli alleli *mlo* che sono stati introdotti in più di 142 cultivar rappresentanti oltre il 40% delle coltivazioni primaverili di orzo in molti paesi nord-europei. Per la peculiarità del gene *mlo* e di alcune sue varianti come *mlo-9* e *mlo-11*, individuare marcatori molecolari strettamente associati a tale locus fornirebbe uno strumento molto potente ai "breeders" per introgredire tali geni in genotipi di interesse agrario. Recentemente Tacconi e collaboratori (2006) hanno sviluppato una serie di marcatori molecolari fortemente associati al locus *mlo*, che permettono di selezionare genotipi recanti tali loci in popolazioni segreganti di orzo. Questo fornisce un indubbio vantaggio visto che il gene di interesse agisce in forma recessiva.

In vite, come è noto, lo studio della resistenza all'oidio rappresenta uno degli obiettivi prioritari per la riduzione dell'uso di prodotti di sintesi in agricoltura. Moltissimi esperimenti sono stati condotti a tutti i livelli scientifici e tecnologici per attenuare la patogenicità del fungo. Una delle strategie che

si sta perseguendo è quella dell'applicazione di strumenti molecolari al fine di ottenere una pianta resistente. I primi studi sono stati già indirizzati verso la comprensione della funzione di uno o più geni di resistenza, attraverso il silenziamento genico (RNA interference: RNAi). È prevedibile che nel volgere di pochi anni sarà possibile attraverso la trasformazione genetica ottenere nuove varietà di vite resistenti.

Il fungo *Pyrenophora graminea* (la cui forma anamorfica è chiamata *Drechslera graminea*) è un patogeno emibiotrofo che causa la striatura bruna delle foglie, una malattia monociclica strettamente associata allo sviluppo dell'embrione di orzo. Il fungo sopravvive come micelio nel pericarpo, nel glume e nelle glumelle, ma non nell'embrione. L'infezione inizia durante la germinazione, quando il micelio, che vive nel pericarpo dei semi infetti, penetra la coleoriza e da lì colonizza la pianta partendo dagli apici radicali. La perdita del raccolto causata da *P. graminea* è correlata al grado di contaminazione dei semi (Porta-Puglia et al., 1986). Sebbene nei sistemi di coltivazione convenzionali la malattia sia controllata mediante trattamento chimico dei semi, è stato calcolato che quando molti semi sono infettati (più del 30%), tale trattamento non è più efficace per ottenere un raccolto accettabile, a meno che la varietà abbia un elevato livello di resistenza (Delogu et al., 1995). Inoltre la produzione dei semi di orzo in coltivazioni organiche, importanti in molti paesi, richiede una maggiore attenzione verso questa fitopatia (Delogu et al., 1995).

Nonostante la grande importanza della resistenza genetica alla striatura bruna, non si possiede ancora una conoscenza completa dei meccanismi molecolari alla base delle interazioni *P. graminea*-orzo. Sono stati identificati e mappati sia i singoli geni di resistenza razza-specifici (Tacconi et al., 2001) che quelli responsabili della resistenza parziale basata sulla poligenicità (Pecchioni et al., 1996; Arru et al., 2003a), ma nessuno è stato ancora clonato e caratterizzato. Recentemente Haegi e collaboratori (2008) hanno svolto uno studio istologico e trascrittomico della resistenza confrontando due linee isogeniche che differivano solo a livello di un locus di resistenza, denominato *Rdg2a*. L'analisi al microscopio della linea resistente NIL3876-*Rdg2a* ha permesso di osservare che la crescita del fungo cessa nel nodo scutellare, mentre nella linea isogenica suscettibile Mirco-*rdg2a* essa continua attraverso il nodo scutellare fino all'embrione.

Per capire le basi molecolari della difesa verso *P. graminea*, sono stati predisposti l'isolamento e la caratterizzazione di *Rdg2a*. Come primo step è stata costruita una mappa genetica ad alto livello della regione cromo-

somica in cui si trova il gene, attraverso lo screening di una popolazione F_2 di 1400 piante, derivate dall'incrocio delle varietà Thibaut (*Rdg2a*) e Mirco (*rdg2a*). La mappa comprendeva alcuni marcatori sviluppati utilizzando sequenze conservate tra geni di resistenza di pianta (Resistance Gene Analogues-RGA) e altri creati sfruttando relazioni sinteniche tra orzo e riso in tale regione. Il sequenziamento in riso non ha rivelato alcun gene con proprietà simili a quelle dei geni R già caratterizzati. Da ciò è stato ipotizzato che *Rdg2a* potrebbe codificare per un nuovo tipo di proteina di resistenza o che la sintenia orzo-riso è interrotta in quella regione (Bulgarelli et al., 2004). Le informazioni ottenute dal mappaggio del locus sono state sfruttate per lo sviluppo di marcatori per approcci di MAS. Analizzando la reazione contro un isolato monoconidiale altamente virulento del patogeno (Dg2) da parte di diverse cultivar e accessioni di orzo, si è osservato che il marcatore MWG2018 era sempre associato al fenotipo resistente (Arru et al., 2003b). Varietà resistenti di orzo ottenute grazie alla selezione basata su questi metodi sono già disponibili.

CONCLUSIONI

Diverse specie di interesse agronomico sono coltivate in aree caratterizzate da condizioni pedo-climatiche sub-ottimali, causa di bassa produttività, instabilità delle produzioni, scarsa qualità. Gli stessi indirizzi della politica agraria comunitaria, stanno determinando una forte domanda di varietà caratterizzate da un'elevata potenzialità produttiva anche in condizioni di limitati input energetici a disposizione della coltura, resistenti a stress biotici e abiotici e stabili nell'espressione quantitativa e qualitativa della produzione. Da ciò deriva la necessità di studi genetico-molecolari che accertino il valore potenziale del germoplasma coltivato e selvatico, e consentano di identificare geni utili per l'adattamento delle piante all'ambiente colturale (Stanca et al., 2003). Le recenti evidenze sperimentali suggeriscono che i geni codificanti per fattori di trascrizione rappresentano i migliori candidati per spiegare un effetto quantitativo sul carattere adattamento. Rispetto ai singoli geni strutturali, effettori della risposta, un fattore di trascrizione può regolare in maniera simultanea e coordinata una serie di geni, l'effetto dei quali si somma determinando il fenotipo (ad esempio un'elevata tolleranza al freddo). Secondo questa ipotesi, variazioni alleliche a geni regolatori possono indurre maggiormente differenze fenotipiche riscontrate rispetto a variazioni nelle sequenze di geni strutturali (Morandini e Salamini, 2003).

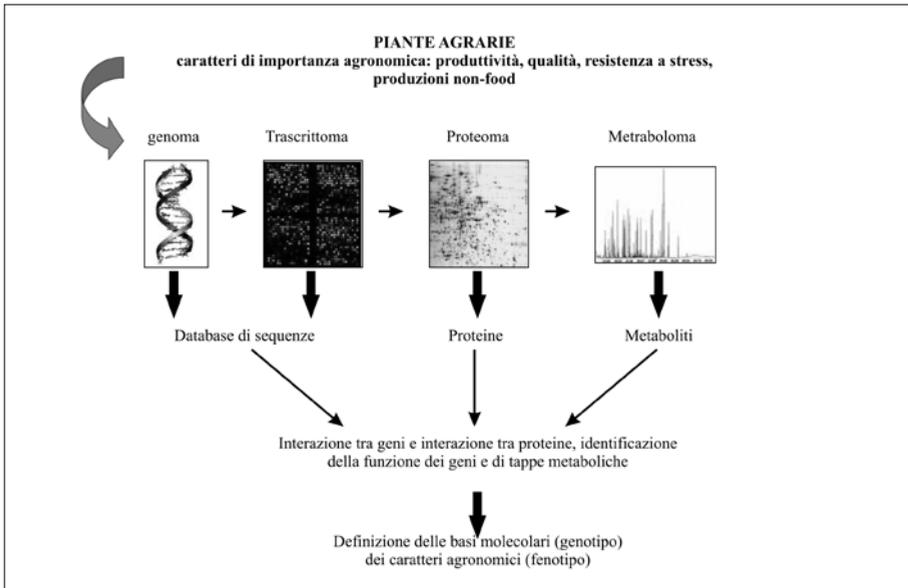


Fig. 2 integrazione dei risultati delle varie discipline 'omiche' – Systems Biology – per la definizione della relazione fenotipo-genotipo

Negli ultimi dieci anni la dimensione e il campo di indagine della biologia molecolare sono notevolmente cambiati, dall'iniziale obiettivo di identificare indipendentemente i vari elementi caratterizzanti un sistema biologico (RNA, gene, proteina) per metterli in relazione in un secondo momento, alla possibilità di caratterizzare la totalità degli elementi oggetto di studio, implementandoli in una rete complessa di interazioni. Le nuove metodologie afferenti alla disciplina della genomica funzionale, quali proteomica, trascrittomica e metabolomica, stanno aprendo la strada allo studio dei networks di regolazione che sottendono il funzionamento degli organismi viventi in determinate condizioni fisiologiche, dipingendo un quadro molto più complesso di quanto fino a oggi avessimo potuto osservare con strumenti di tipo tradizionale. Approcci di tipo computazionale ovviamente sostengono l'integrazione dell'enorme numero di dati prodotti da queste metodologie e possono ad esempio aiutare la descrizione dei processi di adattamento delle piante all'ambiente colturale.

Scopo di questo approccio, definito "system biology", è estrarre la maggiore quantità di informazioni possibili dagli esperimenti multidisciplinari che permettono di studiare il genoma, costruendo modelli esplicativi e predittivi grazie all'uso di strumenti matematici e informatici. Ci si può quindi aspetta-

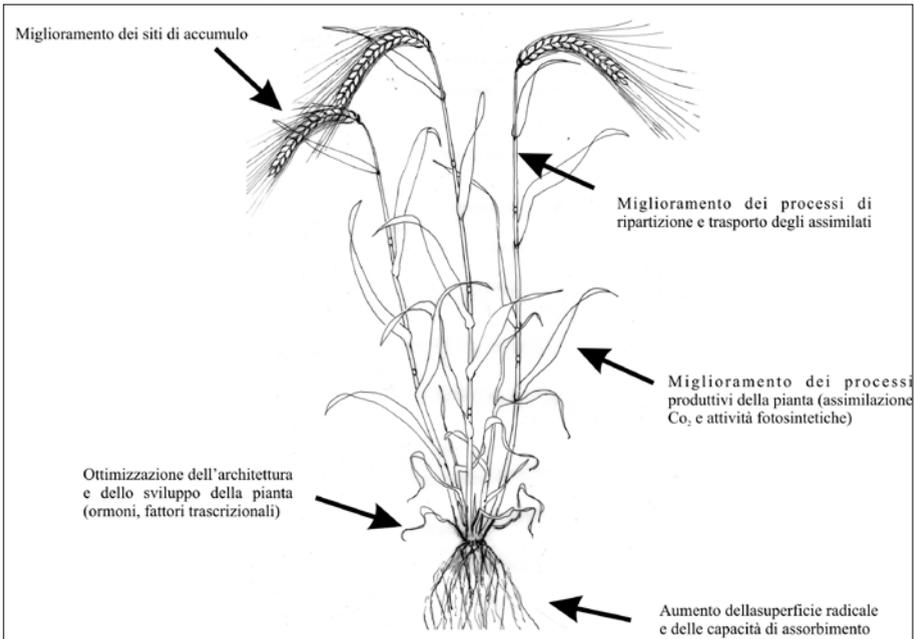


Fig. 3 Il concetto di 'yield enhancement genes' prevede in primo luogo l'individuazione di un ideotipo e in un secondo momento l'introggressione, all'interno di un genotipo ideale, di geni regolatori di caratteri utili

re che tutti i campi di indagine relativi allo studio delle piante possano trarre vantaggio dai progressi delle tecnologie high-throughput e dallo sviluppo della bioinformatica, sfociando in una moderna biologia dei sistemi vegetali (fig. 2).

Il successo di ogni processo di selezione si basa sulla disponibilità di alleli superiori per i caratteri di interesse. Una volta identificati i geni e caratterizzate queste varianti alleliche utili, è estremamente importante che gli sforzi di queste ricerche siano effettivamente sfruttati, al fine di ottenere genotipi con un'elevata resistenza a stress di tipo abiotico e biotico. Rispetto al recente passato, i breeders hanno oggi a disposizione marcatori "robusti", che identificano e permettono di seguire, durante il processo di selezione, gli alleli utili. Il miglioramento genetico assistito consentirà di spostare la selezione dal livello fenotipico a quello genotipico, in un approccio denominato "breeding by design": l'ideotipo di pianta che si vuole ottenere sarà definita e la piramidizzazione in un genotipo superiore di alleli utili ai geni chiave (yield enhancement genes) rappresenterà la strategia per l'ottenimento di nuove va-

rietà adatte ai diversi ambienti di coltivazione e rispondenti sempre più alle esigenze della futura società (fig. 3).

RIASSUNTO

Gli stress ambientali – siccità, basse o alte temperature, suoli poco fertili o infezioni da patogeni – sono le più importanti cause di perdita di produttività in agricoltura e molti sforzi sono stati compiuti per migliorare la produttività delle colture in condizioni limitanti. La selezione naturale ha favorito meccanismi di adattamento e di sopravvivenza, mentre l'attività dei "breeders" ha puntato verso un aumento della resa economica delle specie coltivate di maggior interesse. Più di 80 anni di attività di selezione hanno portato a un significativo incremento nella resa economica delle piante coltivate anche negli ambienti limitanti. Nel frattempo, la ricerca di base ha permesso di approfondire la comprensione dei meccanismi fisiologici e molecolari grazie ai quali le piante rispondono agli stress ambientali; tuttavia vi è ancora un ampio divario tra la produzione in condizioni ottimali e in condizioni di stress. Una più approfondita analisi del genoma fornirà nuovi strumenti per comprendere con più precisione la relazione genotipo-fenotipo e disegnare la pianta del futuro.

ABSTRACT

Environmental constrains, including both biotic and abiotic stresses, cause yield losses. Many efforts have been made to increase productivity of crop plants grown under limiting conditions. While natural selection has favoured mechanisms for adaptation and survival, breeding has directed selection towards an increase of economic yield. More than 80 years of breeding activities have led to some yield increase in stressed environments for many crop plants. Meanwhile, basal research has provided significant gains in the understanding of physiological and molecular responses of plants to environmental stresses. However a large gap is still present between yield potential and actual production. Current and future genomic analyses will produce new tools and knowledge for the future breeding in order to minimize the yield gap by increasing yield potential and stability under different stress conditions.

BIBLIOGRAFIA

- ARRU L., FRANCIA E., PECCHIONI N. (2003a): *Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (Pyrenophora graminea) in the Steptoe_Morex spring barley cross*, «Theor Appl Genet», 106, pp. 668-675.
- ARRU L., FACCINI N., GOVONI C., CATTIVELLI L., PECCHIONI N., DELOGU G., STANCA A.M., VALÈ G. (2003b): *The PCR-based marker MWG2018 linked to the Rdg2a leaf stripe resistance gene is a useful tool for assessing barley resistance in breeding programs*, «Crop Sci», 43, pp. 1036-1042.
- BITTEL P. AND ROBATZEK S. (2007): *Microbe-Associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity*, «Curr Opin Plant Bio», 10, pp. 335-341.

- BULGARELLI D., COLLINS N. C., SACCONI G., DALL'AGLIO E., BRUEGGEMAN R., KLEINHOF A., STANCA A. M., VALÈ G. (2004): *High-resolution genetic mapping of the leaf stripe resistance gene Rdg2a in barley*, «Theor Appl Genet», 108, pp. 1401-1408.
- CATTIVELLI L., BALDI P., CROSATTI C., DI FONZO N., FACCIOLI P., GROSSI M., MASTRANGELO A.M., PECCHIONI N. AND STANCA A.M. (2002): *Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae*, «Plant Mol. Biol.», 48, pp. 649-665.
- CATTIVELLI L., RIZZA F., BADECK F-W., MAZZUCOTELLI E., MASTRANGELO A.M., FRANCIA E., MARE` C., TONDELLI A., STANCA A.M. (2008): *Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics*, «Field Crops Research», 105, pp. 1-14.
- COCKRAM J., JONES H., LEIGH F.J., O'SULLIVAN D., POWELL W., LAURIE D.A., GREENLAND A. (2007): *Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity*, «J Exp Bot», 58, pp. 1231-1244.
- COMADRAN J., RUSSELL J. R., VAN EEUWIJK F. A., CECCARELLI S., GRANDO S., BAUM M., STANCA A. M., PECCHIONI N., MASTRANGELO A. M., AKAR T., AL-YASSIN A., BENBELKACEM A., CHOUMANE W., OUABBOU H., DAHAN R., BORT J., ARAUS J.-L., PSWARAYI A., ROMAGOSA I., HACKETT C. A. AND THOMAS W. T. B. (2008): *Mapping adaptation of barley to droughted environments*, Volume 161, Numbers 1-2.
- CROSATTI C., SONCINI C., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (1995): *The accumulation of a cold-regulated chloroplastic protein is light-dependent*, «Planta», 196 (3), pp. 458-463.
- DE VIENNE D., LEONARDI A., DAMERVAL C. AND ZIVY M. (1999): *Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize*, «Journal of Experimental Botany», Vol 50, pp. 303-309.
- DELOGU G., PORTA-PUGLIA A., STANCA A.M., VANNACCI G. (1995): *Interaction between barley and Pyrenophora graminea: an overview of research in Italy*, «Rachis», 14, pp. 29-34.
- DONINI P., KOEBNER R., POWELL W. (2001): *Contributions of DNA molecular marker technologies to the genetics and breeding of wheat and barley*, «Plant Breeding Reviews», 21, pp. 181-220.
- FRANCIA E., RIZZA F., CATTIVELLI L., STANCA A.M., GALIBA G., TÓTH B., HAYES P.M., SKINNER J.S., PECCHIONI N. (2004): *Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) × 'Tremois' (spring) barley map*, «Theor. Appl. Genet.», 108, pp. 670-680.
- FRANCIA E., TACCONI G., CROSATTI C., BARABASCHI D., BULGARELLI D., DALL'AGLIO E., VALÈ G. (2005): *Marker assisted selection in crop plants*, «Plant Cell Tissue Organ Cult», 82, pp. 317-342.
- FRANCIA E., BARABASCHI D., TONDELLI A., LAIDÒ G., RIZZA F., STANCA A.M., BUSCONI M., FOGHER C., STOCKINGER E.J., PECCHIONI N. (2007): *Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley*, «Theor Appl Genet», 115, pp. 1083-1091.
- HAEGI A., BONARDI V., DALL'AGLIO E., GLISSANT D., TUMINO G., COLLINS N., BULGARELLI D., INFANTINO A., STANCA A.M., DELLEDONNE M., VALÈ G. (2008): *Histological and molecular analysis of Rdg2a barley resistance to leaf stripe*, «Molecular Plant Pathology», in corso di stampa, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2008.00489.X.
- LEVITT J. (1980): *Responses of plants to environmental stresses*, Second edition, vol. II, *Water, radiation, salt, and other stresses*, Academic Press, New York, cap. 7, pp. 213-228.
- MARÉ C., MAZZUCOTELLI E., CROSATTI C., FRANCIA E., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (2004): *Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-respnse in barley*, «Plant Molecular Biology», 55, pp. 399-416.

- MATSUI A., ISHIDA J., MOROSAWA T., MOCHIZUKI Y., KAMINUMA E., ENDO T.A., OKAMOTO M., NAMBARA E., NAKAJIMA M., KAWASHIMA M., SATOU M., KIM J.M., KOBAYASHI N., TOYODA T., SHINOZAKI K., SEKI M. (2008): *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array, «Plant Cell Physiol», 49, pp. 1135-1149.
- MAZZUCOTELLI E., BELLONI S., MARONE D., DE LEONARDIS A.M., GUERRA D., DI FONZO N., CATTIVELLI L., MASTRANGELO A.M. (2006): *The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation*, Current Genomics 7(8), 509-522.
- MAZZUCOTELLI E., MASTRANGELO A.M., CROSATTI C., GUERRA D., STANCA A.M., CATTIVELLI L. (2008): *Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription*, «Plant Science», 174, pp. 420-431.
- MORANDINI P., SALAMINI F. (2003): *Plant biotechnology and breeding: allied for years to come*, «Trends Plant Sci.», 8 (2), pp. 70-75.
- PECCHIONI N., FACCIOLI P., MONETTI A., STANCA A.M., TERZI V. (1993): *Molecular markers for genotype identification in small grain cereals*, 50, pp. 203-219.
- PECCHIONI N., FACCIOLI P., TOUBIA-RAHME H., VALÈ G., TERZI V. (1996): *Quantitative resistance to barley leaf stripe (Pyrenophora graminea) is dominated by one major locus*, «Theor Appl Genet», 93, pp. 97-101.
- PIFFANELLI P., RAMSAY L., WAUGH R., BENABDELMOUNA A., D'HONT A., HOLLRICHER K., JORGENSEN J.H., SCHULZE-LEFERT P. AND PANSTRUGA R. (2004): *A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew*, «Nature», 430, pp. 887-891.
- PORTA-PUGLIA, A., G. DELOGU, AND G. VANNACCI. (1986): *Pyrenophora graminea on winter barley seed: effect on disease incidence and yield losses*, «J. Phytopathol.», 117, pp. 26-33.
- RIZZA F., BADECK F.W., CATTIVELLI L., LI DESTRI O., DI FONZO N., STANCA A.M. (2004): *Use of a water stress index to identify barley genotypes adapted to rainfed and irrigated conditions*, «Crop Science», 44, pp. 2127-2137.
- SHINOZAKI K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (1996): *Molecular responses to drought- and cold-stress*, «Curr. Opin. Biotechnol.», 7, pp. 161-167.
- STANCA A.M., ROMAGOSA I., TAKEDA K., LUNDBORG T., TERZI V., CATTIVELLI L. (2003): *Diversity in abiotic stresses tolerances*, in *Diversity in barley (Hordeum vulgare)* (R. von Bothmer, T. van Hintum, H. Knupffer, K. Sato Eds.), Elsevier Science B. V., pp. 179-199.
- SVENSSON J.T., CROSATTI C., CAMPOLI C., BASSI R., STANCA A.M., CLOSE T.J., CATTIVELLI L. (2006): *Transcriptome analysis of cold acclimation in barley albina and xantha mutants*, «Plant Physiol.», 141 (1), pp. 257-270.
- TACCONI G., CATTIVELLI L., FACCIOLI N., PECCHIONI N., STANCA A.M., VALÈ G. (2001): *Identification and mapping of a new leaf stripe resistance gene in barley (Hordeum vulgare L.)*, «Theor Appl Genet», 102, pp. 1286-1291.
- TACCONI G., BALDASSARRE V., COLLINS N.C., BULGARELLI D., STANCA A.M., AND VALÈ G. (2006): *Haplotype characterization and markers at the barley Mlo powdery mildew resistance locus as tools for marker-assisted selection*, «Genome», 49, pp. 864-872.
- TONDELLI A., FRANCIA E., BARABASCHI D., APRILE A., SKINNER J.S., STOCKINGER E.J., STANCA A.M., PECCHIONI N. (2006): *Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley*, «Theor Appl Genet», 112, pp. 445-454.
- WANG X., NI W., GE X., ZHANG J., MA H., CAO K. (2006): *Proteomic identification of potential target proteins regulated by an ASK1-mediated proteolysis pathway*, «Cell Res.», 16, pp. 489-498.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nel luglio 2009

