

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](http://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;

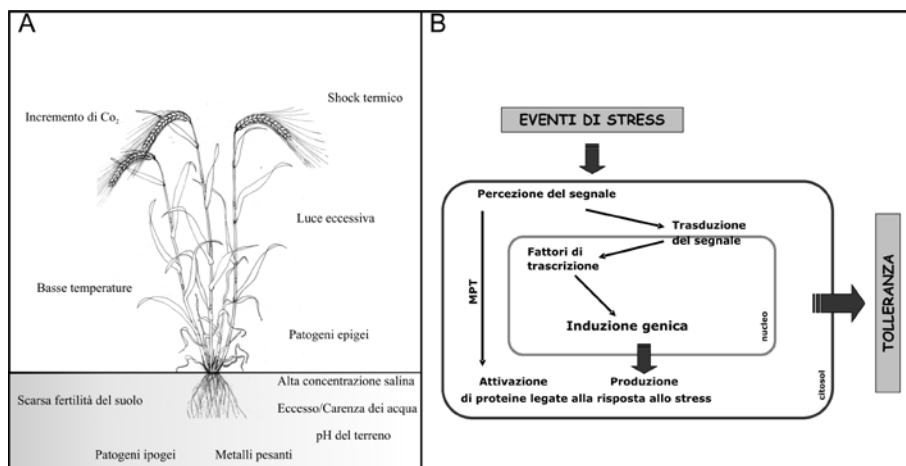


Fig. 1 A) Nell'ambiente culturale le piante sono spesso soggette a vari eventi stressanti di natura differente e con siti di azione specifici, pertanto alcuni stress agiranno sulla parte epigea (emersa) della pianta, altri su quella ipogea (apparato radicale); B) Al verificarsi di un evento di stress, 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 'Nure' 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 colturale 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 ERA-NET 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 (Bittel 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 culturale (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).

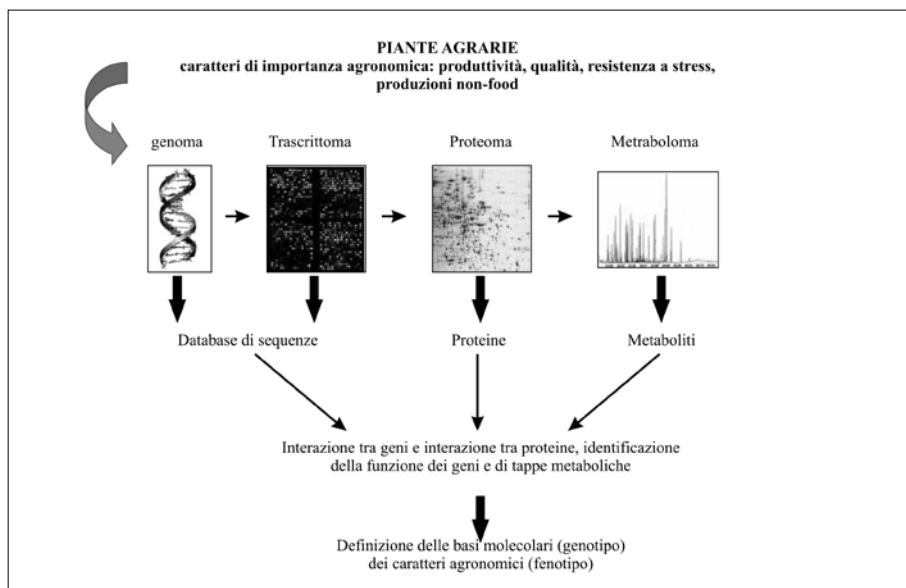


Fig. 2 integrazione dei risultati delle varie discipline 'omiche' – Systems Biology – per la definizione della relazione fenotipo-genotipo

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-



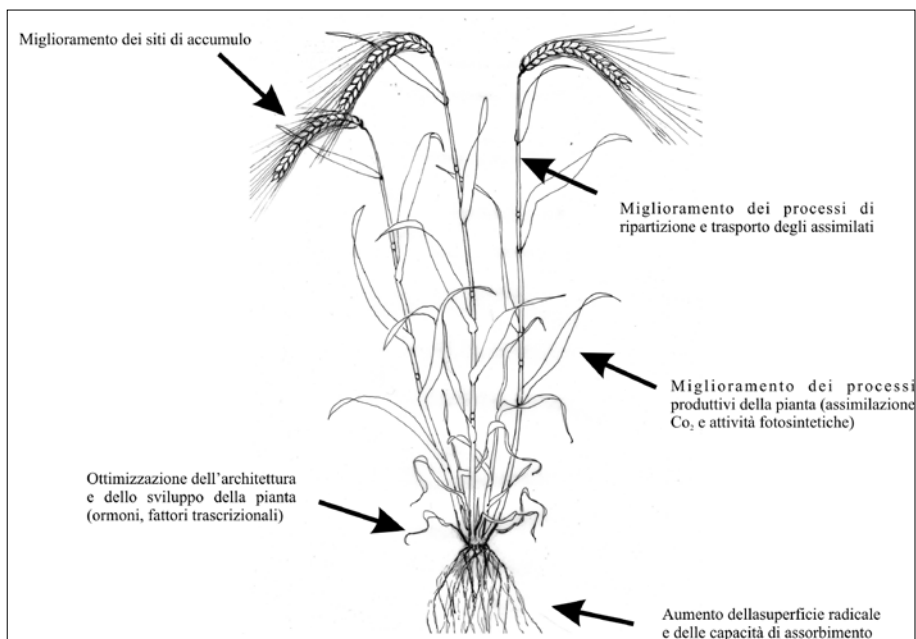


Fig. 3 Il concetto di 'yield enhancement genes' prevede in primo luogo l'individuazione di un ideotipo e in un secondo momento l'introggressione, all'interno di un genotipo ideale, di geni regolatori di caratteri utili

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 constraints, 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., FACCIOLO 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., FACCIOLO P., MONETTI A., STANCA A.M., TERZI V. (1993): *Molecular markers for genotype identification in small grain cereals*, 50, pp. 203-219.
- PECCHIONI N., FACCIOLO 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., FACCINI 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., FRANCA 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



