



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI

XXIV Ciclo

BIO/13

**IL METABOLISMO DELLE OSSILIPINE:
CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE,
LOCALIZZAZIONE ENDOCELLULARE
ED ATTIVAZIONE IN LEGUMINOSE IN RISPOSTA
A STRESS ABIOTICI**

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Tutor: Dott. Angelo Santino

Dottoranda: Stefania De Domenico

Aprile 2012

A Giorgia

ABBREVIAZIONI	7
ABSTRACT	10
RIASSUNTO	12
1. INTRODUZIONE	15
1.1 IMPORTANZA AGRONOMICA DELLE LEGUMINOSE	16
1.2 STRESS ABIOTICI	17
1.2.1 Siccità	18
1.2.2 Eccessiva salinità del terreno	19
1.3 ESPRESSIONE GENICA IN RISPOSTA A STRESS SALINO ED IDRICO	20
1.3.1 Espressione genica in risposta a stress salino e carenza di acqua a livello radicale	22
1.4 LA VIA METABOLICA DELLE OSSILIPINE	24
1.4.1 GLI ENZIMI CHIAVE DEL <i>PATHWAY</i> DELLE OSSILIPINE	25
1.4.1.1 Lipossigenasi	25
1.4.1.2 Enzimi CYP74	26
1.4.1.2.1 Divinil etere sintasi e gli eteri di vinilici	26
1.4.1.2.2 Idroperossidi liasi e la sintesi di aldeidi volatili	26
1.4.1.2.3 Allene ossido sintasi e la sintesi dei jasmonati	28
1.5 OSSILIPINE: MEDIATORI DI SEGNALE	30
1.5.1 Ossilipine prodotte dalla via delle AOS	31
2. SCOPO DELLA TESI	36
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 ESPERIMENTI SULLO STRESS SALINO	38
3.1.1 PRODUZIONE DI PLASMIDI RICOMBINANTI	38
3.1.1.1 Strategia di clonaggio per ottenere plasmidi necessari a silenziare geni	38
3.1.1.2 Materiale vegetale	43
3.1.1.3 Estrazione di RNA	43
3.1.1.4 Sintesi di cDNA	45
3.1.1.5 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	46
3.1.1.6 Analisi di frammenti nucleotidici: elettroforesi su gel	46
3.1.1.7 Eluizione dei frammenti da gel di agarosio	47
3.1.1.8 <i>Topo Cloning Reaction</i>	48
3.1.1.9 Trasformazione di cellule competenti	48

3.1.1.10 PCR su colonia.....	49
3.1.1.11 Estrazione di DNA plasmidico da cellule batteriche.....	49
3.1.1.12 Analisi di sequenza	50
3.1.1.13 <i>LR Recombination reaction</i>	50
3.1.1.14 Digestione enzimatica di DNA.....	51
3.1.2 <i>GENE SILENCING</i> IN PIANTA.....	52
3.1.2.1 Preparazione di cellule competenti <i>Agrobacterium rhizogenes</i> e trasformazione batterica.....	53
3.1.2.3 Sterilizzazione dei semi e condizioni di crescita.....	54
3.1.2.4 Trasformazione radicale con <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	54
3.1.2.5 Trattamenti e valutazione dello stress salino in vitro ed in serra.....	55
3.1.2.6 <i>Real time RT-PCR</i>	55
3.1.2.7 Analisi statistica.....	56
3.1.3 ESPERIMENTI CONDOTTI SU PIANTE DI <i>M. truncatula</i> WT.....	57
3.1.3.1 Semina e trattamento per lo stress salino.....	57
3.1.3.2 Determinazione tramite analisi in HPLC (<i>High Performance</i> <i>Liquid Chromatography</i>) di JA, JA-Ile, OPDA ed Acido Abscissico e acido Salicilico.....	57
3.2 ESPERIMENTI SULLO STRESS IDRICO (SICCITA')......	58
3.2.1 Semina e trattamento per lo stress idrico.....	58
3.2.2 Determinazione del <i>Relative Water Content</i> (RWC).....	58
3.2.3 Estrazione e dosaggio delle clorofille.....	59
3.2.4 Estrazione di RNA e sintesi del cDNA.....	59
3.2.5 <i>Quantitative Real-Time PCR</i>	59
3.2.6 Determinazione tramite analisi in HPLC (<i>High Performance</i> <i>Liquid Chromatography</i>) di JA, JA-Ile, OPDA ed Acido Abscissico	60
3.2.7 Determinazione di idroperossidi in HPLC.....	60
3.2.8 Determinazione di aldeidi in HPLC.....	61
3.3 ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE.....	62
3.3.1 LOCALIZZAZIONE DEGLI ENZIMI IN FOGLIE DI <i>M. truncatula</i>	62
3.3.1.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	62
3.3.1.2 Isolamento e frazionamento biochimico dei cloroplasti.....	62
3.3.1.3 Isolamento e frazionamento biochimico delle membrane tilaciodali.....	62
3.3.2 LOCALIZZAZIONE CELLULARE DI <i>MtHPL</i>	63

3.3.2.1 Costrutti ricombinanti utilizzati.....	63
3.3.2.2 Preparazione di protoplasti da foglie di <i>Nicotina tabacum</i>	64
3.3.2.3 Trasformazione di protoplasti per l'espressione transiente.....	65
3.3.2.4 Microscopia confocale.....	67
3.3.2.5 Frazionamento sub-cellulare.....	67
3.3.2.6 Separazione delle proteine su gel di poliacrilammide.....	69
3.3.2.7 <i>Western blot</i>	70
4. RISULTATI.....	71
4.1 ESPERIMENTI SULLO STRESS SALINO.....	72
4.1.1 Identificazione dei geni chiave del metabolismo delle ossilipine implicati nella risposta a stress salino.....	72
4.1.2 Determinazione mediante HPLC del contenuto di ABA e SA, e di OPDA, JA, JA-Ile in radici di piante di <i>M. truncatula</i> sottoposte a stress salino	73
4.1.3 Ricerca ed amplificazione di regioni altamente conservate dei geni di interesse.....	76
4.1.4 Produzione di costrutti ricombinanti necessari per il silenziamento genico.....	78
4.1.5 Espressione in pianta.....	80
4.1.6 Esperimenti in vitro.....	80
4.1.7 Esperimenti in serra.....	83
4.1.8 Analisi <i>real time</i> RT-PCR dei livelli di espressione genica.....	86
4.2 STRESS IDRICO (SICCITA')	87
4.2.1 Induzione di stress idrico su piante di <i>Cicer arietinum</i> cresciute in serra.....	87
4.2.2 Determinazione dello contenuto in acqua, in clorofilla ed in acido abscissico di piante sottoposte a siccità.....	88
4.2.3 Analisi <i>real-time</i> dell'espressione dei geni <i>lox</i> , <i>hpl</i> , <i>aos</i> , <i>aoc</i> , α - <i>dox</i> e <i>opr</i> a livello radicale in piante di <i>Cicer arietinum</i> sottoposte a stress.....	90
4.2.4 Analisi dei prodotti del metabolismo delle ossilipine in HPLC.....	93
4.3 ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE.....	96
4.3.1 Localizzazione endocellulare degli enzimi del metabolismo delle ossilipine: LOX, HPL, AOS e AOC.....	96
4.3.2 Esperimenti di localizzazione endocellulare in protoplasti di tabacco.....	98
5. DISCUSSIONE.....	101
6. CONCLUSIONE.....	109
7. BIBLIOGRAFIA.....	112
COLLABORAZIONI E RINGRAZIAMENTI.....	125

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI.....	126
--	------------

ABBREVIAZIONI

ABA	acido abscissico
ABA-GE	ABA glucosio coniugato
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACX	acil-CoA-sintasi
AOC	allene ossido ciclasti
AOS	allene ossido sintasi
APS	ammonio persolfato
ATP	adenosin trifosfato
BBY	metodo di frazionamento dei cloroplasti
cDNA	DNA complementare
COI1	<i>coronatine insensitive 1</i>
CYP74	citocromi P450
Clor	cloroplasti
ctr	controllo
C16:3	acido esadecatrienoico
C18:2	acido linoleico
C18:3	acido linolenico
DNA	acido desossiribonucleico
DNase	enzima di idrolisi del DNA
dn-OPDA	dinor-OPDA
DEPC	dietilpirocarbonato
DES	divinil etere sintasi
DMSO	dimetilsolfoossido
DOX	diossigenasi
D.O.	Densità Ottica
DTT	ditiotreitolo
D1	proteina del fotosistema II
α-dox	diossigenasi
ECL	<i>enzymatic chemiluminescence</i>
EDTA	acido etilen-diamin-tetracetico
EHT	acido epossi-esadecatrienoico
EOT	acido epossi-ottadecatrienoico
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FAM	6-carbossi-fluoresceina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLV	<i>Green Leaf Volatiles</i>
Gra	frazione dei grana
GTC	guanidina tiocianato
HEPES	acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico
HFA	<i>Hydroperoxide Fatty Acid</i>
HPHT	acido idroperossiesadecatrienoico
HPLC	cromatografia liquida ad alta pressione
HPOD	acido idroperossiottadecadienoico

HPL	idroperossido liasi
- HPL	la proteina HPL tronca, cioè priva del peptide di transito
HPOT	acido idroperossiottadecatienoico
IC	intervallo di confidenza
JA	acido jasmonico
JA-Ile	jasmonoil-isoleucina
JA-Leu	jasmonoil-leucina
JA-Phe	jasmonoil-fenilalanina
JA-Val	jasmonoil-valina
JAR	<i>JA aminoacid conjugate synthase</i>
JMT	JA carbossi metil trasferasi
JAZ	<i>Jasmonate Acid ZIM-domain</i>
KAT	3-ketoacil-CoA tiolasi
KDa	kiloDalton
Lam	frazione lamellare
LB	Luria-Bertoni
LOX	lipossigenasi
MeJA	metil jasmonato
MFP	proteina multifunzionale
MS	<i>Murashige and Skoog</i>
MYC	fattore di trascrizione di tipo MYC
NAA	acido naftalenacetico
NAD(P)H	nicotinamide adenina dinucleotide (fosfato)
O.N.	<i>Over Night</i>
OPC:8	acido 3-osso-2[2'(Z)-pentenil] ciclopentil-1-ottanoico
OPC:6	acido 3-osso-2[2'(Z)-pentenil] ciclopentil-1-esanoico
OPDA	acido 12-ossofitodienoico
OPR	acido 12-ossofitodienoico riduttasi
PCR	reazione a catena della polimerasi
PF	peso fresco
PS	peso secco
PT	peso turgido
PUFA	<i>PolyUnsaturated Fatty Acid</i>
RE	reticolo endoplasmico
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNA	acido ribonucleico
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNAse	enzima di idrolisi del RNA
ROS	specie reattive dell'ossigeno
RQ	quantità relativa
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
RWC	<i>Relative Water Content</i>
SA	acido salicilico
SCF	<i>Skp/Cullin/F-box</i>
SDS	Sodio Dodecil Solfato

Str	frazione stromatica
TAE	Tris-Acetato EDTA
TAMRA	6-carbossi-tetrametil-rodamina
TCs	<i>Tentative Consensus sequences</i>
TD	Treonina Deaminasi
TE	TRIS EDTA
TF	fattore di trascirizione
Til	frazione tilacoidale
Tot	frazione totale
TP	peptide di transito
TRIS	tris(idrossimetil)amminometano
UniTag	<i>Unique 26 pb Tag</i>
UPLC	Cromatografia liquida de ultra pressione
UV	UltraVioletti
wt	<i>wild type</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

ABSTRACT

Legumes are important crop in sustainable agriculture because they can provide high value protein, support meat and dairy production and are unique in their ability to improve soil fertility through their symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. However, legumes are sensitive to a number of abiotic stresses such as water deficit and soil salinity, which are a main cause of crop loss worldwide.

Plants have evolved complex cell signalling pathways activating metabolic functions and developmental switches to cope with environmental stresses. Dissection of molecular mechanisms controlling plant response to environmental stresses is crucial to provide legume crops with improved stress tolerance.

In a previous work, microarray analysis showed that among hormone and secondary metabolism category, four key-genes involved in the oxylipins metabolism were up-expressed in salt tolerant genotype, *M. truncatula* Jemalong A17, under salt stress condition. They are lipoxygenase (*lox*), hydroperoxide-lyase (*hpl*), allene oxide synthase (*aos*) and allene oxide cyclase (*aoc*). Furthermore, in another study, SuperSAGE technique was applied to the analysis of gene expression in chickpea roots in response to drought and salt stress. In both abiotic conditions, two genes, i.e a lipoxygenase and allene oxide synthase, involved in oxylipins pathway were up-regulated.

In this context, an important agronomic grain legume, chickpea (*Cicer arietinum*), and the model legume species *M. truncatula* (Jemalong A17) were subjected to drought and salt stress respectively to understand the possible involvement of this class of heterogeneous compounds in the response of legumes to abiotic stresses.

At first, gene silencing experiments were carried out on *Medicago* plants. A RNA interference (RNAi) approach adopted to down-regulate the expression of *lox*, *hpl*, *aos* and *aoc* genes, yielded transgenic roots whose growth was valuated in presence and in absence of salt. Our results showed that *aoc*-RNAi and *aos*-RNAi roots were less sensitive to the presence of salt in the medium. Preliminary chemical analysis indicated a reduction in OPDA content in these roots; the possible absence of oxylipins (JA and JA-Ile) produced from OPDA could indicate an important role of jasmonats in the “bonsai effect”, a typical plant response to abiotic stresses.

As far as the chickpea is concerned, we took advance of the SuperSAGE information available for this species to design new Taqman probes to study the expression of key genes involved in oxylipins metabolism. Therefore, qPCR was carried out on root samples from a drought-tolerant and a drought-sensitive chickpea variety. Our results indicated a sustained and earlier activation

of a specific lipoxygenase (*lox1*) gene, two hydroperoxide lyases (*hpl1* and *hpl2*), an allene oxide synthase (*aos*) and an oxo-phytodienoate reductase (*opr*) genes in the drought tolerant variety. These data were confirmed by the quantification of the main oxylipins derived from the AOS branch of the pathway. Higher levels of jasmonic acid (JA), its precursor 12-oxophytodienoic acid (OPDA) and the active form JA-isoleucine (JA-Ile) were detected in the root tissues of the tolerant variety, suggesting a role of jasmonates in the early signalling and in the tolerance mechanism in response to drought stress.

This data was supported by HPLC analysis on *M. truncatula* plants subjected to salinity for different stress point. In these plants we founded high levels of JA and JA-Ile already at 1 hour from stress onset.

HPLC quantification of other oxylipins on *Cicer arietinum* roots, i.e. the aldehydes produced by the HPL branch, indicated a hexanal accumulation only later during drought stress, thus suggesting a competition for the same substrate between AOS and HPL enzymes at earlier stress time points.

In this context, we carried out a biochemical characterisation of the main enzymes of the oxylipin pathway detected in *M. truncatula* leaves. Western blot analysis suggested a thylacoid localisation for *MtAOS* and *MtAOC*, and a stromal for *MtLOX*. An unexpected distribution was founded for *MtHPL*: this protein, despite a plastidial transit peptide (TP₅₉) in N-terminal region, was not detected in the chloroplast fraction. These results were confirmed by confocal microscopy analyses obtained expressing some chimeric fluorescent proteins related to the *M. truncatula* HPL cDNA.

Token together results from this research indicated an important role of jasmonates in the early signalling of abiotic stresses.

RIASSUNTO

Le leguminose sono un importante fonte proteica vegetale e rappresentano circa il 25% delle produzioni agricole mondiali. Essendo ricche di amido e sali minerali, rivestono un ruolo fondamentale nell'alimentazione umana ed in quella degli animali da allevamento; inoltre la loro capacità di instaurare rapporti di simbiosi a livello radicale con organismi azoto fissatori, le rende autosufficienti dal punto di vista degli input chimici. Tuttavia, come altre colture di interesse agronomico, risultano essere sensibili a stress di varia natura (biotici ed abiotici) che ne limitano la produttività. Tra gli stress abiotici, la carenza idrica e l'eccessiva salinità del terreno risultano essere tra le più importanti cause di perdita di produzione agricola, sia nelle regioni Mediterranee che a livello mondiale. Le basi fisiologiche di siccità e salinità si sovrappongono, essendo entrambe causa di stress osmotico. La capacità delle piante di sopravvivere in condizioni ambientali avverse dipende dalla loro abilità di adattarsi ai cambiamenti dell'ambiente circostante. Per far ciò, hanno sviluppato una serie di meccanismi regolatori che implicano l'attivazione di particolari molecole segnale, mediatrici della risposta adattativa richiesta.

La crescita e lo sviluppo della pianta sono strettamente dipendenti dal sistema radicale della pianta stessa e dal suo ruolo nel rifornimento di acqua e sali minerali. Gli stress abiotici legati al suolo, come appunto la siccità o la salinità del terreno, influiscono in maniera rilevante sulla crescita e l'architettura della pianta, essendo la radice l'organo che maggiormente risente di tali condizioni ambientali. Anche a tale livello, il recupero di funzionalità di questo tessuto avviene per opera di alcuni geni che adattano lo sviluppo radicale a condizioni ambientali avverse.

Dati sperimentali, ottenuti analizzando l'espressione genica di leguminose modello che presentano un recupero nella crescita radicale dopo essere state sottoposte a stress salino, evidenziano un potenziale coinvolgimento, oltre che di geni regolatori, anche di alcuni geni coinvolti nel metabolismo di una particolare classe di composti: le ossilipine. Inoltre, analisi SuperSAGE, atte a caratterizzare l'espressione genica in risposta a stress idrico e salino in leguminose di interesse agronomico quali il cece (*C. arietinum*), hanno evidenziato una sovra-espressione di geni codificanti per alcuni enzimi implicati in tale metabolismo, in piante che presentano una maggiore tolleranza a tali tipi di stress.

Per analizzare più in dettaglio il ruolo fisiologico della via biosintetica delle ossilipine nella risposta a stress abiotici, quali appunto la siccità e l'eccessiva salinità del suolo, sono stati dapprima allestiti esperimenti di *silencing* genico in radici di leguminose modello (*Medicago truncatula*) sottoposte a stress salino e poi analisi di espressione genica e quantificazione chimica dei prodotti di tale metabolismo su piante di cece, sottoposte a stress idrico.

Gli esperimenti di silenziamento dei geni *lox* (lipossigenasi), *hpl* (idroperossidi liasi), *aos* (allene ossido sintasi) e *aoc* (allene ossido ciclastasi) in radici di *M. truncatula* (genotipo Jemalong A17) hanno permesso di ottenere piantine composite sulle quali è stato valutato l'accrescimento radicale, in presenza ed in assenza di stress salino. Risultati, statisticamente significativi, sono stati ottenuti su radici *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi sottoposte a stress, che presentano un allungamento radicale maggiore, paragonabile al rispettivo controllo cresciuto in assenza di sale. In queste radici inoltre, analisi preliminari hanno confermato un minore accumulo di OPDA, il precursore dell'acido jasmonico (JA), prodotto dalla azione a cascata degli enzimi AOS e AOC. Tale condizione potrebbe far supporre un minore accumulo di acido jasmonico e così un'inibizione del cosiddetto "effetto bonsai" dovuto all'azione del JA.

Parallelamente, le analisi di espressione genica condotta su piante di cece indicano chiaramente il coinvolgimento di tale via metabolica nella prima fase della risposta allo stress idrico. Dal confronto di due varietà differenzialmente adattate alla siccità, ICC 1882 (sensibile) e ICC 4958 (tollerante), è emerso che nel genotipo tollerante sottoposto a stress viene sovra-regolato sia il ramo della via metabolica relativo ad HPL (implicata nella biosintesi di aldeidi volatili) che quello relativo a AOS (strettamente correlata alla sintesi di acido jasmonico). Tali risultati sono stati confermati dall'analisi quantitativa delle principali ossilipine accumulate a livello radicale durante lo stress idrico. In particolare, si è evidenziata una forte induzione di acido jasmonico e jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) nella varietà tollerante, nelle prime ore di stress. Per quanto concerne la produzione di aldeidi volatili, i dati indicano una tardiva biosintesi di aldeidi a sei atomi di carbonio solo a tempi più lunghi dall'induzione dello stress in entrambe le varietà, con livelli più alti registrati nel genotipo sensibile. Questi risultati potrebbero indicare una scarsa disponibilità dei substrati per le isoforme di HPL espresse nei tessuti radicali nelle fasi precoci di induzione dello stress.

I risultati relativi alla rapida induzione di acido jasmonico nella risposta della radice allo stress sono stati avvalorati da un lavoro di analisi chimica condotto su piantine di *M. truncatula* sottoposte a stress salino. Anche in questa leguminosa modello, sottoposta ad uno stress osmotico, si evidenzia un rapido accumulo a livello radicale di JA e JA-Ile, già ad un'ora dall'inizio dello stress.

Infine, lo studio della localizzazione dei principali enzimi coinvolti nella via metabolica risulta particolarmente importante per verificare la disponibilità dei substrati per l'attività catalitica dei vari enzimi operanti nel *pathway* metabolico delle ossilipine.

Il frazionamento sub-cellulare di foglie di *M. truncatula* e la successiva analisi *western* ha permesso di determinare una localizzazione tilacoidale per MtAOS e MtAOC e stromale per

MtLOX. Un *pattern* di localizzazione inaspettato è stato invece osservato per l'idroperossido liasi che non sembra avere una localizzazione plastidiale, nonostante la presenza di un putativo peptide di transito per il cloroplasto. Analisi di microscopia confocale utilizzando costrutti chimerici derivati dalla fusione di HPL, del solo peptide di transito e della restante parte della proteina con un *tag* fluorescente (GFP) hanno permesso di ipotizzare la presenza di altri segnali all'interno della proteina responsabili del *sorting* della proteina ai plastidi. La proteina quindi potrebbe legarsi dall'esterno al cloroplasto ed entrarvi a seguito di induzione del segnale di stress.

Complessivamente, i risultati dell'attività svolta durante il dottorato di ricerca, indicano un importante ruolo della famiglia delle fito-ossilipine, ed in particolare degli jasmonati, nelle fasi precoci della risposta delle leguminose agli stress abiotici.

INTRODUZIONE

1. INTRODUZIONE

1.1 IMPORTANZA AGRONOMICA DELLE LEGUMINOSE

Le leguminose sono un importante fonte proteica vegetale e rappresentano circa il 25% delle produzioni agricole mondiali. Inoltre, essendo ricche di amido e sali minerali come calcio, ferro e magnesio, rivestono un ruolo fondamentale nell'alimentazione umana ed in quella degli animali da allevamento.

La loro rilevanza nel sistema agricolo è in continua crescita perché, più di qualsiasi altra coltura, rispondono alle attuali esigenze di sicurezza e di eco-compatibilità. Infatti, le note capacità di fissare l'azoto atmosferico e di mobilizzare i fosfati, grazie alle simbiosi con microrganismi rizosferici, le rendono autosufficienti dal punto di vista delle concimazioni.

Le leguminose sono definite “piante miglioratrici”, in quanto sono in grado di aumentare la produttività delle colture che le seguono, molto spesso cereali, avendo quindi un ruolo fondamentale nella gestione della fertilità del terreno. Hanno un effetto disgregante poiché le radici fittonanti esercitano un'azione meccanica che conferisce al suolo buona porosità, sofficità e permeabilità e quindi lo rendono di più facile lavorazione. Le colture di copertura inoltre esercitano un controllo sull'erosione del terreno, proteggendo la superficie dall'azione dell'acqua e del vento; stimolano la decomposizione dei residui colturali e il riciclo dei nutrienti grazie alla fornitura di composti azotati utili ai microrganismi preposti al processo di trasformazione di tali residui. Infine, tramite la competizione ed il soffocamento, sono in grado di esercitare un'azione di controllo sulla crescita della flora infestante.

Le leguminose sono quindi elementi chiave per un'agricoltura sostenibile e possono offrire molti benefici economici ed ambientali. Tuttavia, come altre colture di interesse commerciale, risultano essere sensibili a stress di varia natura (biotici ed abiotici) che ne limitano la produttività (Manchanda & Garg, 2008).

Molte di esse, compresa la specie modello *Medicago truncatula*, presentano genotipi differentemente adattati a diverse condizioni ambientali; il confronto nel *pattern* di espressione di determinati geni in queste varietà, potrebbe rappresentare un punto di partenza per l'identificazione di geni chiave nella risposta di queste piante a stress di tipo abiotico.

1.2 STRESS ABIOTICI

Gli stress abiotici, definiti come qualsiasi causa di natura fisica o chimica che limita lo sviluppo e la crescita della pianta, provocano seri danni alla produttività e alla qualità dei prodotti agricoli. Si stima che soltanto il 10% della superficie coltivata nel mondo può essere classificata nella categoria “*non stress*”, mentre il restante 90% (con diversa intensità) può essere soggetta a stress singoli o combinazioni di essi (Sharma & Lavanya, 2002).

La resistenza agli stress abiotici, definita come “capacità della pianta di sopravvivere, crescere e produrre in presenza del fattore sfavorevole” (Levitt, 1980), implica l’evolversi di specifici meccanismi distinti secondo la seguente classificazione:

- *escape* (evitare l’avversità): la pianta reagisce modificando il proprio ciclo vitale così da evitare le ostilità ambientali. Ad esempio, terminando il proprio ciclo vitale prima del sopraggiungere della stagione secca, sfuggendo così alla siccità estiva;
- *avoidance* (evitare lo stress): la pianta reagisce allo stress creando barriere morfologiche o fisiologiche. Ad esempio, chiudendo gli stomi per evitare un’eccessiva traspirazione durante periodi di siccità;
- *tolerance* (tollerare lo stress): la pianta attiva meccanismi attivi e diretti a livello molecolare per resistere ed adattarsi allo stress o per riparare i danni provocati dallo stesso.

La tolleranza o la sensibilità ad un determinato stress abiotico, risultano essere meccanismi complessi poiché associati ad interazioni multigeniche, molto spesso difficili da comprendere.

Nelle regioni Mediterranee il freddo e la siccità sono gli stress abiotici più frequenti; tuttavia nelle zone aride limitrofe al mare l’eccesso di sale nel terreno risulta essere un problema molto diffuso. Inoltre i cambiamenti climatici, con la diffusione di piogge irregolari e prolungati periodi di siccità, hanno moltiplicato gli effetti di tale stress compromettendo la buona resa di produzione agricola.

L’eccessiva salinità del suolo non è solo una caratteristica tipica di un terreno, ma può essere riscontrata anche in terreni coltivati, a seguito di una insufficiente irrigazione. Le basi fisiologiche di siccità e salinità quindi si sovrappongono: la salinità infatti induce una perdita di acqua, provoca quindi tossicità ionica, stress ossidativo, squilibrio osmotico e di nutrienti (Vinocur & Altman, 2005; Mahajan & Tuteja, 2005), alterazioni che si riscontrano anche a seguito di carenza idrica. Queste condizioni, portano a modificazioni nella struttura della pianta, soprattutto a livello radicale, inibizione della crescita o addirittura a morte della pianta stessa (Marchan e coll., 2007). Nelle leguminose, la salinità e la siccità portano a significativi cambiamenti di importanti parametri agronomici quali riduzione nella altezza della pianta e nella

grandezza delle foglie, nella biomassa, nel numero di piante e soprattutto nell'accumulo di proteine a livello di seme nelle leguminose (Chang e coll., 1994; Wan e coll., 2002).

1.2.1 Siccità

La carenza idrica influenza negativamente la stabilità e la qualità della produzione di quasi tutte le specie coltivate. Il deficit idrico nella cellula si verifica quando il tasso di traspirazione supera quello di assorbimento; tale fenomeno è tuttavia una componente comune a stress diversi quali la siccità, la salinità del terreno, il freddo, il caldo, la presenza di metalli nel terreno e l'attacco massiccio di parassiti.

La risposta avviene a livello di coltura, pianta singola, tessuti e cellule e dipende dalla quantità di acqua perduta, dal tasso di perdita e dalla durata dello stress. Normalmente il quantitativo di acqua presente nella pianta è di circa 85%. Quando la perdita di acqua è limitata (<10%) il danno è reversibile e il recupero della funzione può essere totale al ristabilirsi dell'equilibrio; il danno invece è irreversibile quando la perdita di acqua è più intensa (30-40%) ed il recupero delle funzioni, in seguito ad una ottimale re-idratazione, è seriamente compromesso.

La siccità è uno stress multi-dimensionale; può infatti colpire la pianta in diverse fasi del ciclo vegetativo, con tempi più o meno prolungati (da pochi minuti fino anche a settimane o mesi), provocando una serie di sintomi che vanno dalla chiusura degli stomi fino all'inibizione della fotosintesi ed alla morte. Induce stress meccanico a livello radicale dovuto all'aridità del suolo; stress osmotico per la disidratazione a livello cellulare ed extracellulare e stress ossidativo per l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Kovtun e coll., 2000).

In queste condizioni, la pianta accelera le fasi di sviluppo al fine di convogliare tutte le sostanze di riserva negli organi riproduttivi per garantire la sua sopravvivenza; a livello radicale si osserva un aumento di sviluppo delle radici, grazie all'aumento di produzione di essudati polisaccaridici ed acidi per la ricerca e la cattura di umidità del suolo (Whitmore & Whalley, 2009); mentre in fusto/foglie si ha una riduzione della perdita di acqua attraverso la chiusura degli stomi, la riduzione della superficie e dell'esposizione fogliare oppure attraverso aggiustamenti osmotici (presenza di cere, l'accumulo di osmoliti).

1.2.2 Eccessiva salinità del terreno

Tutti i suoli contengono sali la cui quantità dipende dalle condizioni climatiche, morfologiche, pedologiche ed idrologiche del territorio. Quando la quantità di sali solubili (solfati, cloruri e bicarbonati di sodio, potassio, calcio e magnesio) diviene eccessiva, al punto tale che le colture ne risentono negativamente, il terreno viene classificato come salino.

La salinizzazione impedisce la crescita delle piante in quanto limita la loro capacità di rifornirsi di acqua, provoca squilibri nutrizionali e induce fenomeni di tossicità. E' un processo tipico degli ambienti dove le precipitazioni non sono sufficienti ad eliminare i sali contenuti nel suolo. In genere il fenomeno si accentua in presenza di falde acquifere poco profonde, dalle quali l'acqua trasporta i sali verso la superficie; in climi moderatamente umidi; nelle depressioni con fondo impermeabile, dove confluiscono le acque provenienti dalle aree circostanti i cui terreni o sedimenti contengono sali. Un tipo di salinizzazione, detta secondaria, è frequente nei terreni irrigati. Ciò è dovuto a vari fattori: apporto di acque di irrigazione non idonee i cui sali si concentrano nel terreno a causa della evapo-traspirazione; innalzamento del livello delle falde acquifere, uso di forti dosi di concimi chimici e di bassi volumi di acqua.

A livello fisiologico le piante subiscono tre tipi di danni da salinità: osmotico, nutrizionale e tossico (Greenway & Munns, 1980). A questi si aggiungono quelli derivanti da asfissia radicale, causata dalla riduzione della permeabilità dei terreni, e quando nell'acqua d'irrigazione il contenuto di sodio, rispetto a quello del calcio e del magnesio (SAR, *Sodium Absorption Ratio*), è elevato. I danni osmotici, legati al basso potenziale idrico del terreno, sono dovuti ad una riduzione del turgore cellulare, che comporta alterazione dei processi metabolici ed inibizione della crescita. Lo stress nutrizionale, invece, è dovuto alla competizione ionica nei processi di assorbimento radicale. Il danno tossico, infine, può influire sia sulla funzionalità di membrana, alterando la permeabilità ed il trasporto, sia sulle attività enzimatiche danneggiando processi metabolici quali fotosintesi e respirazione.

Il grado di tossicità dei diversi sali varia con la specie, lo stadio di sviluppo della pianta e con il sistema di coltivazione. Per esempio cotone, riso e grano sono meno resistenti alla salinità da NaCl che da Na₂SO₄ (Strogonov e coll., 1970), mentre il fagiolo ed il lino mostrano un comportamento opposto (Sheoran & Garg, 1983; Sharma & Gupta, 1986). L'erba medica è più influenzata da Na₂SO₄, K₂SO₄ ed NaCl rispetto ad MgCl₂ ed a MgSO₄. Fagiolo e grano sono più influenzati dalla salinità da CaCl₂ rispetto a quella da NaCl (Bernstein, 1964; Aceves e coll., 1975), mentre la risposta è opposta nel mais. Per molte specie i carbonati sono più tossici dei cloruri e dei solfati.

E' stato proposto un modello bifasico di crescita in risposta alla salinità (Munns, 2002). Sulla base di questa ipotesi la crescita risulta inibita inizialmente dalla ridotta assunzione di acqua a livello radicale, causata dal basso potenziale idrico del terreno. In questa fase la pianta va incontro ad uno stress osmotico la cui entità è indipendente dal tipo di sale, ma dipendente dalla pressione osmotica da esso esercitata; si ha l'attivazione di un segnale di tipo ormonale che, partendo dalla radice, raggiunge la parte aerea della pianta. Una seconda inibizione della crescita è dovuta ad uno stress di tipo tossico che si manifesta prima nelle foglie vecchie, che muoiono a causa del rapido incremento della concentrazione salina nelle pareti cellulari o nel citoplasma, quando i vacuoli non sono più in grado di contenere gli ioni tossici. Se la perdita delle foglie più vecchie è superiore alla neosintesi, si manifesta un calo nella disponibilità di assimilati con consistenti danni alla crescita.

A livello cellulare, nelle piante non esiste un vero e proprio trasportatore specifico per l'assimilazione del sodio (Na^+), ma questo ione entra nella cellula mediante competizione con altri cationi, ed in particolare con lo ione potassio (K^+). Tale meccanismo è regolato da un sistema antiporto Na^+/H^+ , in dipendenza dal gradiente elettrochimico di H^+ che si instaura tra regioni intracellulare ed extracellulare.

Tuttavia risulta difficile discriminare quale sia lo ione che, tra Na^+ e Cl^- , induce per primo la sofferenza della pianta; in soia sembra che l'omeostasi di entrambi, e soprattutto la loro compartimentalizzazione inter ed intracellulare, sia fondamentale per la tolleranza dello stress da parte della pianta (Phang e coll., 2008).

1.3 ESPRESSIONE GENICA IN RISPOSTA A STRESS SALINO ED IDRICO

La capacità delle piante di sopravvivere in condizioni ambientali avverse e raggiungere la maturità riproduttiva dipende dalla loro abilità di adattarsi a differenti condizioni dell'ambiente circostante. Per far ciò, le piante hanno sviluppato una serie di meccanismi regolatori che implicano la precedente attivazione di particolari molecole segnale, mediatrici della risposta adattativa richiesta.

Differenti geni sono stati caratterizzati per avere un ruolo nella protezione della pianta in condizione di stress: in mancanza di acqua o in presenza di sale si ha la regolazione di geni implicati nella modificazione della parete e delle membrane cellulari, di geni coinvolti nella sintesi di specie antiossidanti oppure di altri che regolano l'efficienza di traspirazione agendo sulla chiusura stomatica, come *ERECTA* (Masle e coll., 2005); *TNHX1* e *TVP1*, protone antiporto e protone pirofosfatasi rispettivamente, aumentano la tolleranza alla salinità in *Arabidopsis* (Brini e coll., 2005; Brini e coll., 2007a); diverse isoforme di deidrine, che lavorano

come chaperoni per acidi nucleici ed altre proteine, sono coinvolte nei fenotipi resistenti a siccità e salinità di grano duro (DHN-5, LEA, ERD), accumulandosi in embrioni maturi e proteggendo le membrane dalla disidratazione (Brini e coll., 2007b).

In condizioni di siccità o di eccessiva salinità del suolo, viene attivata la sintesi ed inattivato il catabolismo di osmoliti, molecole che fungono da soluti compatibili con il basso potenziale osmotico cellulare (Hasegawa e coll., 2000). Questi composti idrofilici, con basso peso molecolare, non influenzano il normale pH cellulare e non interferiscono con le normali funzioni metaboliche. Chimicamente si distinguono in: polioli/zuccheri (saccaropina, trealosio, raffiniosio, galattinolo, sorbitolo, mannitolo, fruttani), aminoacidi e poliammine (BCA, *Branched Chain Aminoacids*; proline, putrescine) composti amminici (glicinabetaina e dimetilsolfoniopropinato) ed alcaloidi (trigonelline) (Cortina & Culianez-Macia, 2005; Holmstrom e coll., 2000).

In condizioni di stress salino, di fondamentale importanza è il mantenimento dell'omeostasi ionica a livello cellulare, regolata soprattutto dal sequestro di ioni Na^+ dal citoplasma. In frumento sono stati individuati svariati loci di tolleranza al sale, implicati nella discriminazione tra Na^+ e K^+ , e quindi il loro differente accumulo a livello cellulare, favorendo il K^+ rispetto al Na^+ . In soia il gene *CmCLC1*, che codifica per un trasportatore deputato al sequestro di ioni Cl^- dal citosol, localizzato a livello di tonoplasto, sembra essere indotto da KCl, NaNO_3 , KNO_3 , LiCl, NaCl e carenza di acqua (Li e coll., 2006). Il sistema antiporto Na^+/H^+ (*GmNHX1*), sempre localizzato sul tonoplasto, funziona sequestrando il Na^+ dal citosol e sembra essere regolato anch'esso da KCl, NaNO_3 , KNO_3 , LiCl, NaCl, carenza di acqua e da un segnale di tipo ormonale, mediato da acido abscissico (ABA, Sun e coll., 2006).

Molti componenti che rispondono allo stress idrico (acquaporine, vie metaboliche ABA-indipendenti e ABA-dipendenti) potrebbero essere indotti dallo stress osmotico conseguente le alte concentrazioni di sale (Hasegawa e coll., 2000). Numerosi studi sperimentali hanno supportato l'ipotesi che il fitormone ABA sia coinvolto nel *signaling* chimico di fusto e radici in risposta a deficit idrico (Wilkinson & Davies, 2002; Davies e coll., 2005). L'acido abscissico è sintetizzato nella parte aerea della pianta, dove regola i movimenti stomatici ed i meristemi apicali, e può traslocare nella radice, dove gioca un ruolo importante nella regolazione dell'intensità del segnale. Tuttavia, il meccanismo che porta alla sintesi di ABA subito dopo l'induzione di uno stress percepito a livello radicale, come appunto la salinità o il deficit di acqua, risulta essere ancora dibattuto. Un modello proposto da Goodger & Schachtman (2010) in *Zea mays* propone che, subito dopo l'induzione dello stress idrico, viene indotto il trasporto di alcune molecole segnale che, traslocando attraverso lo xilema, inducono la sintesi di acido abscissico. Quest'ultimo a sua volta induce la chiusura degli stomi e viene trasportato alla radice

attraverso il floema, dove promuove l'assorbimento di acqua dal suolo e l'espressione di geni per la resistenza allo stress. Se lo stress persiste, β -glucosidasi espresse in radice idrolizzano la forma inattiva di ABA glucosio-coniugato qui accumulato (ABA-GE), provocando il rilascio di ulteriori molecole di ormone; l'acido abscissico viene quindi ridistribuito alle foglie, ricominciando così un nuovo ciclo (Goodger & Schachtman, 2010). Gli Autori identificano tali molecole come solfati (SO_4) radicali, ma anche altri composti potrebbero giocare un ruolo importante in tale meccanismo.

1.3.1 Espressione genica in risposta a stress salino e carenza di acqua a livello radicale

La crescita e lo sviluppo della pianta sono strettamente dipendenti dal sistema radicale della pianta stessa, dal suo ruolo nel rifornimento di acqua e sali minerali. Gli stress abiotici legati al suolo, come appunto la siccità o la salinità del terreno, influiscono quindi in maniera rilevante sulla crescita e l'architettura della pianta, essendo la radice l'organo che maggiormente risente di tali condizioni ambientali.

La crescita della radice ed il recupero di funzionalità a seguito condizioni ambientali avverse avviene per opera di alcuni geni che adattano lo sviluppo radicale a queste situazioni.

Per quanto riguarda lo stress salino, svariati geni regolatori, inclusi fattori di trascrizione (TF), sono coinvolti nella risposta da parte della pianta allo stress (Gruber e coll, 2009): tra questi, fattori di trascrizione tipo TFIIIA, *RNA-binding protein*, piccole proteine G omologhe a ROP9, un *receptor-like kinase*, un fattore di trascrizione tipo AP2 ed una istidina chinasi associata con il *pathway* di trasduzione delle citochinine (Marchan e coll., 2007).

In particolare, de Lorenzo e collaboratori (2007) hanno confrontato l'espressione genica a livello radicale di due genotipi di *M. truncatula*, uno più sensibile (108-R) ed uno più tollerante (Jemalong A17) allo stress. Le piantine sono state trattate per 4 giorni con NaCl 150 mM, a tale concentrazione infatti si verifica una riduzione sostanziale nella crescita radicale del genotipo sensibile, mentre nel tollerante (Jemalong A17) l'effetto è meno pronunciato. Utilizzando un microarray composto da 384 geni coinvolti nella risposta allo stress salino (Marchan e coll, 2007), si è potuto osservare una sovra-regolazione di 112 geni nella specie più tollerante, l'11,6% dei quali sono risultati essere geni implicati nella risposta ormonale e nel metabolismo secondario. Un ulteriore lavoro di Gruber e collaboratori (2009), finalizzato ad indagare sul profilo di espressione genica indotta da stress salino in *M. truncatula* (Jemalong A17), è stato condotto utilizzando il microarray Mt16K+ composto da circa 16000 TCs (*Tentative Consensus sequences*) derivanti da 164000 EST (*Expressed Sequence Tags*) di *M. truncatula* ottenute da TIGR *M. truncatula* Gene Index 5 (<http://www.tigr.org/tdb/mtgi>). Da tale indagine è risultato

che 824 geni (tra cui 84 TF) mostrano differenze di espressione in radici sottoposte e non a stress salino (100 mM NaCl per 1 ora) e 558 di essi sono sovra-regolati. Tra questi ultimi, oltre a diversi geni implicati nel metabolismo di fenilpropanoidi, flavonoidi, isoprenoidi, geni implicati nella risposta a stress abiotici o coinvolti nel *pathway* di etilene, sono stati ritrovati geni coinvolti nella sintesi di jasmonati.

Parallelamente, alcuni lavori atti a caratterizzare l'espressione genica in risposta a stress, sono stati effettuati in leguminose di interesse agronomico della specie *C. arietinum*, in condizioni di carenza idrica. Tale esame è stato effettuato in radici sottoposte a siccità per 6 ore, per mezzo di esperimenti SuperSAGE supportati da RT-PCR. In cece infatti, come in altre specie di interesse agronomico considerate minoritarie, non sono disponibili dati riguardanti il trascrittoma. In NBCI (*National Centre of Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) le EST relative a *C. arietinum* infatti non sono più di 7580. Perciò l'analisi SuperSAGE, versione migliorata del *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), è presa in considerazione per queste specie. Grazie a tale approccio molecolare è infatti possibile sequenziare sino a 100000 *tag* (piccole parti di cDNA di 26 pb) in un singolo esperimento. Utilizzando tale approccio, Molina e collaboratori (2008) hanno descritto 80238 trascritti rappresentanti 17493 UniTag (*Unique 26 pb Tag*). Tale studio ha evidenziato una sovra-espressione di diversi geni tra i quali anche una lipossigenasi e geni implicati nel metabolismo delle ossilipine, in piante di cece tolleranti alla siccità (varietà ILC 588) e sottoposte allo stress.

Ulteriori indagini su cece (Molina e coll., 2011), ma in condizioni di stress salino (25 mM NaCl, per 2 ore), sono state condotte utilizzando un protocollo avanzato di SuperSAGE (deepSuperSAGE). L'analisi di 86919 *tag* ha permesso di caratterizzare 17918 UniTag da radici di una varietà di cece tollerante alla salinità (INRAT-93). Tra di essi 20000 trascritti sono coinvolti nel metabolismo delle ossilipine e 20 UniTag sono ascrivibili a 9 differenti lipossigenasi, mentre 5 di esse sono riportabili a 2 allene ossido sintasi. Ulteriori esperimenti di RT-PCR hanno inoltre confermato una sovra-regolazione di alcune di queste lipossigenasi e per le due isoforme di allene ossido sintasi.

1.4 LA VIA METABOLICA DELLE OSSILIPINE

Le lipossigenasi sono coinvolte nella sintesi di una particolare classe di molecole derivanti dalla ossigenazione e dall'ulteriore trasformazione dei PUFA (*PolyUnsaturated Fatty Acid*). Questi derivati lipidici sono composti comuni a piante ed animali e sono associati dal termine di ossilipine. La maggior parte di essi è sintetizzata enzimaticamente nella via metabolica delle lipossigenasi, definita appunto “via metabolica delle ossilipine”.

Con il termine di ossilipine, si identifica un gruppo di metaboliti secondari così chiamati perché derivanti dagli idroperossidi degli acidi grassi polinsaturi. Tale gruppo comprende importanti molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, indotto da stress di varia natura; tra di esse troviamo idroperossidi degli acidi grassi, α -ketoacidi, eteri divinilici, aldeidi ed altre molecole volatili, l'ormone vegetale acido jasmonico (JA, *Jasmonic Acid*,) ed il suo precursore acido 12-osso-fitodienoico (OPDA, *12-oxophytodienoic acid*,).

E' stato dimostrato che alcune ossilipine inducono l'accumulo di fitoalessine (Zeringue e coll., 1991), altre inibiscono la germinazione dei semi (Gardner e coll., 1990), oppure agiscono come molecole segnale per indurre geni di difesa (Bate & Rothstein, 1998; Koch e coll., 1999; Arimura e coll., 2001; De Moraes e coll., 2001; Farag & Parè, 2002; Engelberth e coll., 2004; Kishimoto e coll., 2005; Block e coll., 2005).

Questo gruppo eterogeneo di metaboliti gioca un ruolo fondamentale nella risposta patologica di piante ed animali. Il ruolo biologico delle ossilipine nelle piante è paragonabile a quello svolto dagli eicosanoidi negli animali (Howe & Schilmiller, 2002). Anche negli animali, esse partecipano ai processi di difesa dell'organismo: la formazione di prostaglandine e leucotrieni, che negli animali viene attivata durante i processi infiammatori, trova omologia con la sintesi di acido jasmonico nei tessuti vegetali (Anderson, 1989). Inoltre, l'acido salicilico e l'acido acetilsalicilico sono inibitori di tali vie metaboliche: negli animali gli acidi salicilici inibiscono la formazione delle prostaglandine (Noordermeer e coll., 2001a), mentre nelle piante inibiscono la formazione dell'acido jasmonico.

Numerosi studi quindi dimostrano il coinvolgimento delle ossilipine in diversi processi fisiologici della pianta, dallo sviluppo alla riproduzione, la senescenza e la risposta a vari tipi di stress soprattutto di tipo biotico (Huges e coll., 2009; Mita e coll., 2007; Vellosillo e coll., 2007). Il coinvolgimento di questa classe di composti nella risposta a stress di tipo abiotico infatti è ancora poco chiaro; tuttavia i dati riportati in precedenza suggeriscono un loro possibile ruolo nell'adattamento della pianta a condizioni ambientali sfavorevoli.

1.4.1 GLI ENZIMI CHIAVE DEL METABOLISMO DELLE OSSILIPINE

Nelle piante, la via metabolica delle ossilipine viene indotta soprattutto durante l'interazione con patogeni o insetti ed in seguito a stress da ferita che provocano distruzione del tessuto cellulare e la conseguente idrolisi di glicerolipidi da parte di acil-idrolasi endogene (Matsui e coll., 2006). Questo porta alla liberazione di acidi grassi polinsaturi contenenti dieni coniugati, come l'acido linoleico (18:2) e acido linolenico (18:3), ed alla loro successiva ossidazione per azione del primo enzima implicato nel *pathway* delle ossilipine: una lipossigenasi (LOX).

1.4.1.1 Lipossigenasi

Le piante esprimono numerose isoforme di lipossigenasi codificate da famiglie multigeniche, che possono essere distinte in base al loro *pattern* d'espressione, alla localizzazione sub-cellulare ed alla specificità di substrato o di prodotto (Hildebrand e coll., 1998; Shewe e coll., 1998). Le LOX sono diossigenasi contenenti un atomo di ferro non-eme; in presenza di ossigeno catalizzano l'inserzione regio/stereo-specifica di tale atomo in posizione 9 o 13 della catena a diciotto atomi di carbonio dell'acido linoleico ($\omega 6$) e linolenico ($\omega 3$), con conseguente produzione di acido idroperossiottadecadienoico (9/13-HPOD) o di acido idroperossiottadecatrienoico (9/13-HPOT) rispettivamente (Vick, 1993).

La produzione di prodotti specifici porta alla distinzione di due gruppi di lipossigenasi: 9- e 13-LOX. Le 9-LOX, anche classificate come LOX di tipo 1 (Mita e coll., 2001; Park e coll., 2010), sono caratterizzate da un'alta omologia di sequenza (circa 60-70%) e dall'assenza di un peptide di transito per il cloroplasto, presentando quindi una localizzazione citosolica. Le 13-LOX (di tipo 2) sono invece caratterizzate da una bassa omologia di sequenza (circa 35%) e sono enzimi plastidiali in quanto presentano nella regione N-terminale un peptide di transito per il cloroplasto (Feussner & Wasternack, 2002; Liavonchanka & Feussner, 2006; Gao e coll., 2008; Farmaki e coll., 2007). Alcune LOX inoltre hanno una doppia specificità di prodotto, come nel caso della lipossigenasi del seme di pisello (*Pisum sativum*) e di nocciolo (*Corylus avellana*), che portano alla sintesi di 9- e 13-idroperossidi a partire dall'acido linoleico (Hughes e coll., 1998; Santino e coll., 2003).

La diversa localizzazione cellulare di tali enzimi indica che distinti *pool* di idroperossidi possono essere prodotti dall'azione di diverse isoforme LOX in risposta a differenti segnali di stress. Tali prodotti inoltre rappresentano il substrato per l'azione di altri enzimi posti a valle della via metabolica, la cui azione porta infine alla sintesi di diverse ossilipine.

1.4.1.2 Enzimi CYP74

Gli idroperossidi dei PUFA prodotti dalle LOX sono molecole altamente reattive e tossiche per le piante e vengono rapidamente metabolizzate da una serie di enzimi quali: l'idroperossido liasi (HPL), l'allene ossido sintasi (AOS) e la divinil etere sintasi (DES), perossigenasi ed epossidi alcol sintasi (Noormender e coll., 2001b). Alcune di queste proteine (HPL, AOS e DES) sono tra loro correlate e formano una classe particolare di citocromi P450, specializzata nel metabolismo degli idroperossidi e denominata CYP74 (Matsui e coll., 1996). Gli enzimi CYP74 si distinguono dagli altri citocromi P450 in quanto non legano l'ossigeno molecolare ma utilizzano gli acidi grassi già ossigenati come donatori e fonte di equivalenti riducenti. Inoltre, la reazione da loro catalizzata non richiede l'intervento di alcun cofattore, come ad esempio NADPH (Mosblech, 2009; Hughes e coll., 2009).

1.4.1.2.1 Divinil etere sintasi e gli eteri divinilici

La divinil etere sintasi (DES), agisce sugli idroperossidi in modo regio/stereo-specifico (Grechkin e coll., 1997) trasformandoli in eteri divinilici degli acidi grassi, come l'acido eterolenico e colnelenico prodotti dai 13- e 9-HPOT rispettivamente. E' stato dimostrato che DES viene indotta in prossimità di tessuti infettati da patogeni, partecipando così alla risposta locale di difesa.

1.4.1.2.2 Idroperossidi liasi e la sintesi di aldeidi volatili

Le idroperossido liasi (HPL), catalizzano la rottura del legame C-C adiacente al gruppo idroperossidico (Noormender e coll., 2001a) e producono aldeidi volatili a sei o nove atomi di carbonio ed acidi carbossilici a nove o dodici atomi di carbonio.

Alcune HPL (13-HPL) presentano una forte specificità per i 13-idroperossidi derivanti dall'acido linolenico e linoleico, con conseguente produzione di acido 12-osso-(Z)-9- dodecanoico e di (Z)-3-esenale ed esanale rispettivamente (Matsui, 2006; Hughes e coll., 2009). L'acido carbossilico derivante dall'acido linolenico è il precursore dell'acido 12-osso-(10E)-dodecanoico, noto come "traumatina", molecola con attività simil-ormonale. La sua sintesi è rapidamente indotta dallo stress da ferita ed ha un ruolo importante nell'induzione della crescita cellulare e nella riparazione dei danni (Zimmerman & Coudron, 1979), con formazione di un callo protettivo intorno alla ferita (Psylinakis e coll., 2001). Oltre a queste, 9/13-HPL sono state rinvenute nella famiglia delle *Cucurbitaceae* e in specie come *Medicago* spp, riso e mandorlo (Tijet e coll., 2001; Mita e coll., 2005; Chehab e coll., 2006; De Domenico e coll., 2007). Le 9/13-HPL utilizzano sia i 9- che i 13-idroperossidi e, diversamente dalle 13-HPL distribuite solo nei tessuti

verdi, si riscontrano anche in tessuti sotterranei come nel caso dell'idroperossido liasi di riso (*OsHPL1*) e di *Medicago truncatula* (*MtHPLF*) (Chehab e coll., 2006; De Domenico e coll., 2007).

Le aldeidi prodotte infine possono essere ulteriormente convertite negli alcoli corrispondenti per azione di alcol-deidrogenasi, acetilate o isomerizzate con la conseguente produzione di altri composti volatili ((2E)-esanolo ed esanolo ed i loro acetati). Tutti questi composti sono importanti costituenti del *Green Leaf Volatiles* (GLV) e sono rapidamente rilasciati dalla piante soprattutto in seguito a danno meccanico (Fig.1.1).

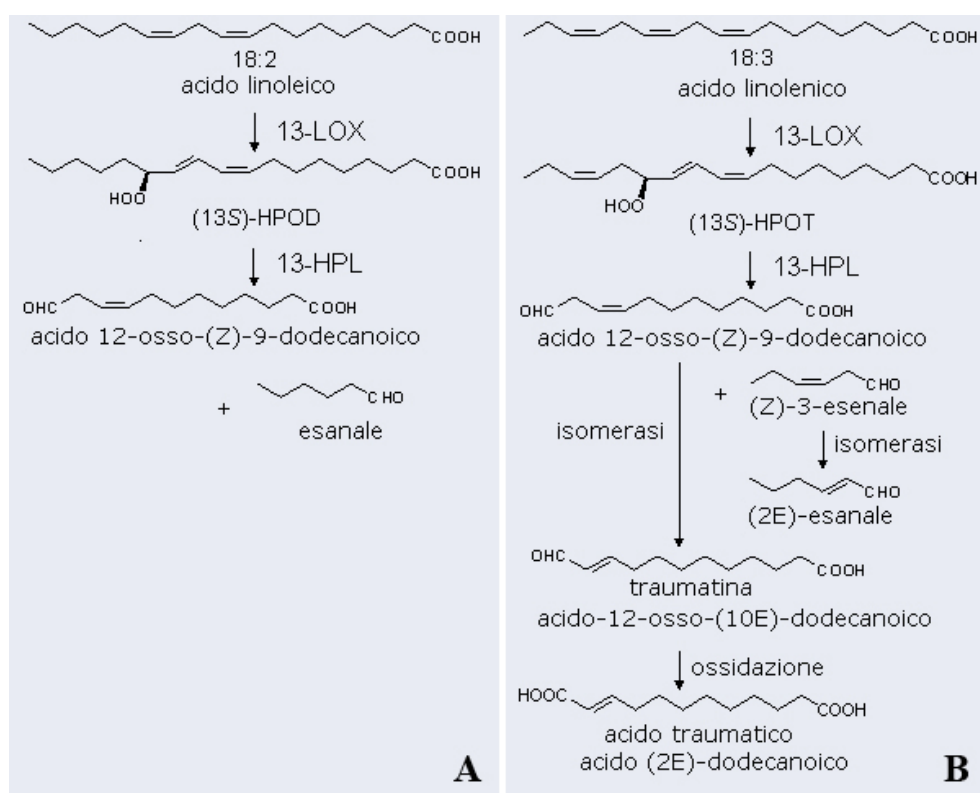


Figura 1.1 Pathway metabolico delle 13-HPL che utilizzano come substrato gli acidi 13-idroperossioottadecadienoico (**A**) e 13-idroperossioottadecatrienoico (**B**) con produzione di esanale ed esenale rispettivamente.

1.4.1.2.3 Allene ossido sintasi e la sintesi dei jasmonati

Le allene ossido sintasi (AOS) disidratano gli idroperossidi dei PUFA. Quando gli acidi 13(S)-idroperossioctadecatrienoico (13-HPOT) e 11(S)-idroperossiesadecatrienoico (11-HPHT, derivante dall'azione di una 13-LOX sull'acido esadecatrienoico, C16:3) sono utilizzati come substrato, due ossidi allenici instabili vengono prodotti: acido 12,13-(S)-epossi-octadecatrienoico (12,13-EOT) e 10,11-(S)-epossi-esadecatrienoico (10,11-EHT). Questi rappresentano il primo passaggio per la sintesi dell'acido jasmonico. In presenza di AOC (allene ossido ciclasi) infatti questi sono convertiti rispettivamente in acido 12-osso-fitodienoico (OPDA) e dinor-OPDA (dn-OPDA) (Wasternack, 2007; Schaller & Stintzi, 2009; Wasternack & Kombrink, 2010) (Fig.1.2). La presenza di AOC è necessaria per la sintesi di acido jasmonico; esperimenti di RNA antisense del gene provocano infatti una diminuzione dei livelli di JA in *Lycopersicon esculentum* (Hause e coll., 2000). Alcune specie, come *Arabidopsis thaliana* ed altre *Brassicaceae*, accumulano OPDA e dn-OPDA esterificati in galattolipidi plastidiali (Buseman e coll., 2006; Kourtchenko e coll., 2007). Questi composti lipidici sono chiamati arabidopsidi e fungono da stoccaggio di prodotti intermedi della via biosintetica, per permettere una rapida sintesi di JA. OPDA e dn-OPDA infatti vengono liberati a seguito dell'intervento di specifiche acil idrolasi plastidiali (DGL e DAD, oppure PLA-I γ 1) oppure grazie all'intervento di lipasi extraplastidiali, come AtPLA1 (Yang e coll., 2007; Ellinger e coll., 2010).

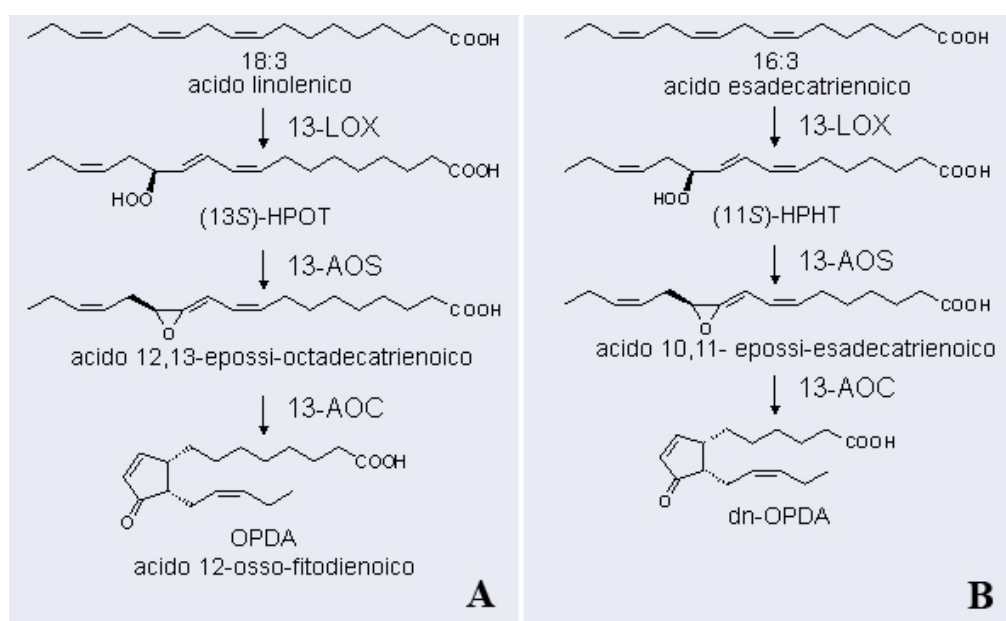


Figura 1.2 Azione a cascata degli enzimi 13-LOX, AOS e AOC a partire dagli acidi linolenico (A) ed esadecatrienoico (B) per ottenere OPDA e dinor-OPDA rispettivamente.

OPDA e dn-OPDA sono infine convertiti in JA ad opera di una OPDA-redattasi (OPR) e di tre cicli di β -ossidazioni (Schaller e coll., 2005) in un diverso compartimento cellulare: i perossisomi.

In *Arabidopsis* un trasportatore ABC (*ATP-binding cassette*), codificato dal gene COMATOSE (*cts*), è coinvolto nel trasporto di OPDA o della sua forma esterificata-CoA nei perossisomi fogliari. Tuttavia, i bassi livelli di JA in mutanti difettivi *cts*, fanno supporre la presenza di un ulteriore meccanismo di trasporto per OPDA (Theodolou e coll., 2005).

OPR catalizza la riduzione di OPDA e dn-OPDA in acido 3-osso-2-(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC-8:0) ed esanoico (OPC-6:0) rispettivamente. Specifiche acil-CoA sintetasi attivano OPC-8:0 e OPC-6:0 come esteri-CoA, sottoposti poi a due (per OPC-6:0) o tre (per OPC-8:0) β -ossidazioni per ottenere l'acido jasmonico. Un ciclo alternativo per ottenere OPDA/dn-OPDA-CoA potrebbe avvenire nel citosol o nei perossisomi prima del passaggio di riduzione. I cicli di β -ossidazione coinvolgono l'azione di tre diversi enzimi: un acil-CoA-sintasi (ACX), una proteina multifunzionale (MFP) e un 3-ketoacil-CoA tiolasi (KAT). In un ultimo passaggio, il jasmonoil-CoA è idrolizzato per rilasciare JA nel citosol dove verrà utilizzato per ottenere le sue varianti bioattive. L'acido jasmonico infatti è stato identificato in svariati derivati ottenuti dalla coniugazione con aminoacidi come isoleucina, leucina, valina, alanina, ecc. (JA-Ile, JA-Leu, JA-Val, ecc.), dalla sua metilazione per ottenere il composto volatile metil-jasmonato (MeJA), oppure idrossilato in C-12 per avere l'acido tuberónico che può successivamente essere sulfonato o glicosilato o ridotto in C-6 per ottenere acido cucurbico (Buseman e coll., 2006; Mosblech e coll., 2009; Schaller & Stintzi, 2009; Wasternack & Kombrink, 2010). Alcuni degli enzimi implicati in queste modificazioni sono: il JMT (*JA metil-transferasi*), JAR (*JA aminoacid coniugate synthase*) ed il sulfotransferasi coinvolto nella biosintesi di 12-HSO₄-JA (Gidda e coll., 2003; Staswick & Tiryaki, 2004).

Tuttavia solo alcuni dei derivati sopra elencati sembrano attivare una risposta fisiologica legandosi a recettori specifici, mentre gli altri sono composti inattivi che fungono da precursori o prodotti di scarto del processo di disattivazione dell'acido jasmonico. Il metil-jasmonato (MeJA) ad esempio è un composto volatile capace di oltrepassare le membrana plasmatica e di esercitare la sua funzione a distanza. Il jasmonoil-isoleucina (Ja-Ile) può essere accumulato in organelli e vacuoli ed essere traslocato attraverso le membrane o trasportato attraverso lo xilema dalle radici alle foglie o viceversa (Poltronieri e coll., 2011).

La natura instabile degli ossidi allenici e la loro purezza riscontrata nei tessuti vegetali, fanno supporre un stretta associazione tra AOS e AOC all'interno dei plastidi (Fig. 1.3). In patata ad esempio le proteine LOX, HPL e AOS sono state riscontrate a livello dei tilacoidi, con HPL

esposta sullo stroma; questa segregazione potrebbe sottolineare il diverso flusso metabolico tra i due rami della via delle lipossigenasi. AOC invece presenta solo una debole interazione con le membrane tilacioidali presentando anche una localizzazione stromatica, necessaria forse al rilascio dei suoi prodotti al di fuori dei plastidi (Farmaki e coll., 2007; Elliger e coll., 2010).

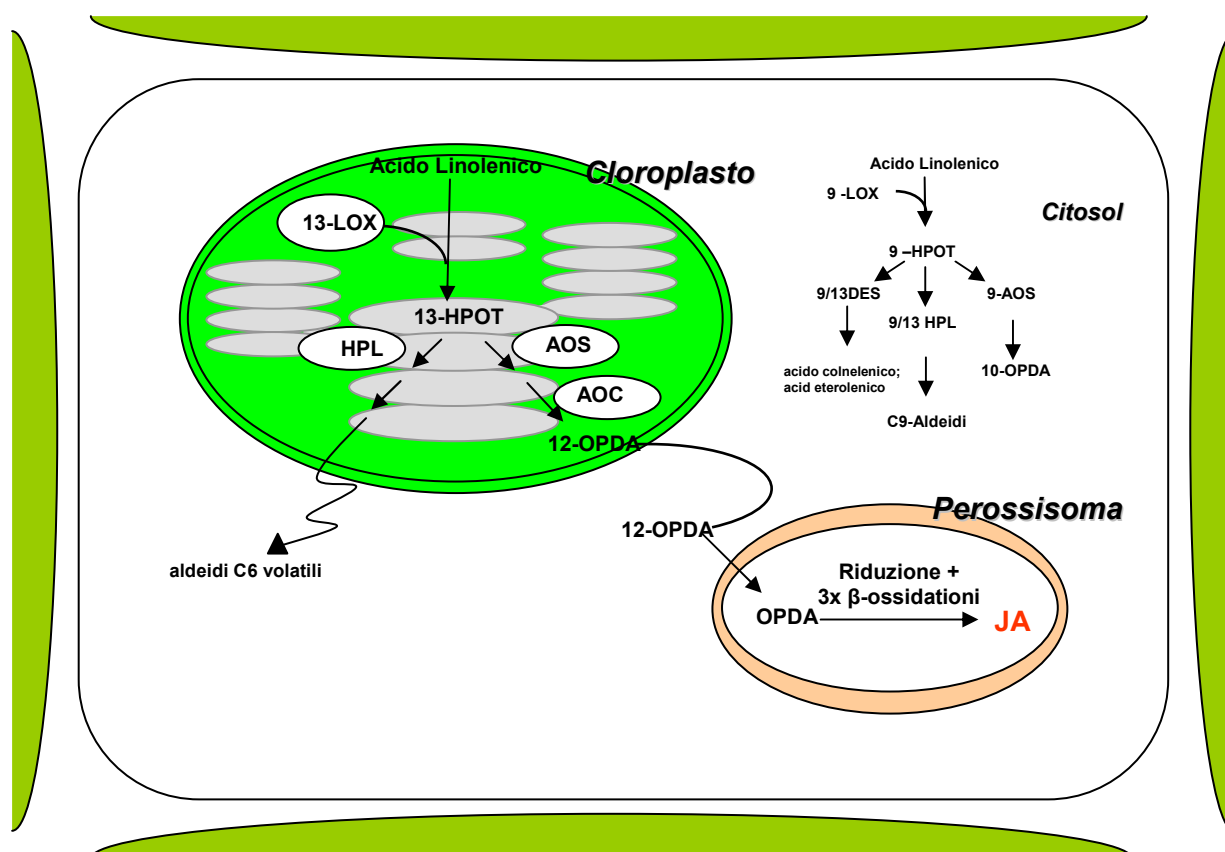


Figura 1.3 Localizzazione cellulare degli enzimi chiave per la biosintesi di aldeidi volatili e jasmonati.

1.5 OSSILIPINE: MEDIATORI DI SEGNALE

Le piante utilizzano ormoni e composti correlati come segnali per comunicare il loro stato di stress, derivante da una zona infettata, all'interno dello stesso organismo o a piante vicine oppure per una particolare condizione ambientale. Alcuni di questi segnali, JA, MeJA e JA-Ile possono essere traslocati, altri fungono da segnali volatili (aldeidi).

Le ossilipine sono un gruppo eterogeneo di composti. Alcune di esse presentano attività antimicrobica (Prost e coll., 2005; Mita e coll., 2007), altre sono molecole segnale coinvolte

nell'induzione di una risposta locale o sistemica; molte presentano sia una che l'altra attività biologica, implicando quindi una relazione tra le due (Santino e coll., 2011).

1.5.1 Ossilipine prodotte dalla via delle AOS

In pianta solo le LOX di tipo 2 sono associate alla produzione di acido jasmonico (De Domenico e coll., 2007). In tale biosintesi, l'attivazione a cascata di 13-LOX, allene ossido sintasi (AOS) e allene ossido ciclastasi (AOC) porta alla produzione di OPDA, il precursore di acido jasmonico. Quest'ultimo può essere metilato da una metil-trasferasi (Fig. 1.4) oppure coniugato all'isoleucina (JA-Ile). MeJA è un composto vattatile che può oltrepassare la membrana plasmatica ed esercitare la sua azione a distanza; JA-Ile può accumularsi in organelli e vacuoli, o traslocare attraverso lo xilema dalle radici alle foglie e viceversa.

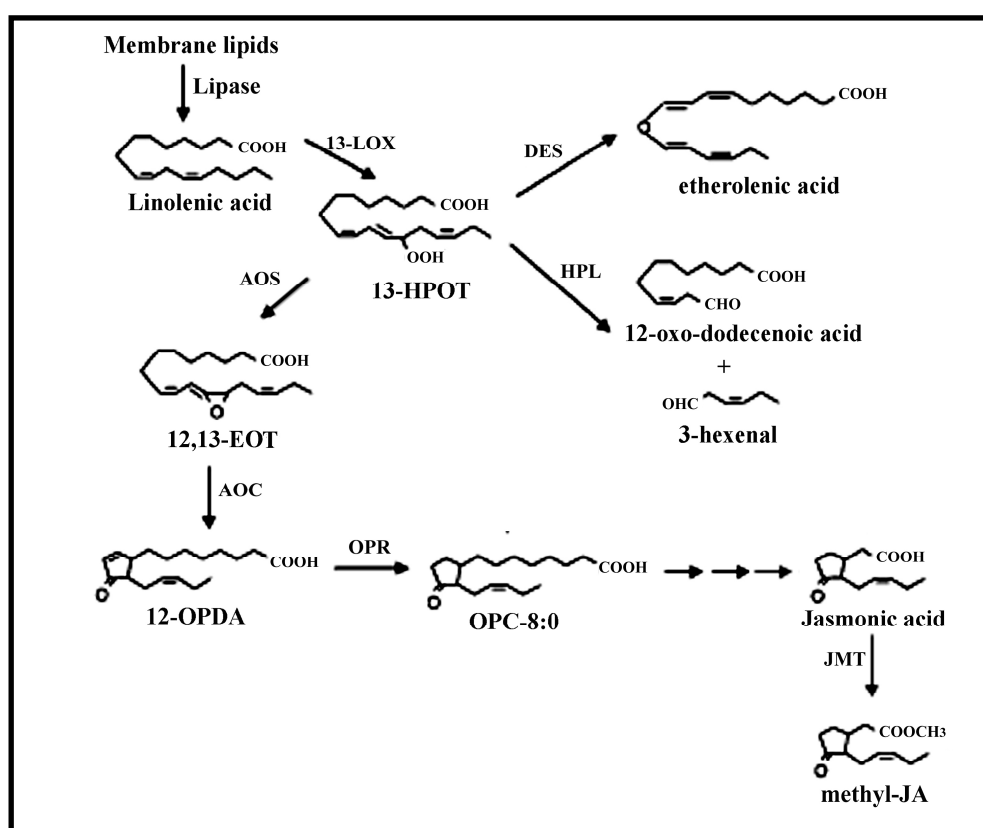


Figura 1.4 Pathway della lipossigenasi per il metabolismo dell'acido α-linolenico.

LOX: lipossigenasi; HPOT: Acido (S)-idroperossi-(10E,12Z,15Z)-ottadecatrienoico; AOS: allene ossido sintasi; HPL: idroperossidi liasi; DES: divinil etere sintasi; OPR: OPDA reduttasi, OPDA: acido osso-fitodienoico; EOT: acid epossi ottadecatrienoico; OPC: acido 8-[3-osso-2-cis-{(Z)-2-pentenil}ciclopentil]-ottanoico (OPC-8:0).

I jasmonati sono importanti regolatori cellulari coinvolti in diversi processi di sviluppo della pianta e sono accumulati in maniera differente nei diversi tessuti, a seconda dello stadio di sviluppo e delle condizioni ambientali (Wasternack & Kombrink, 2010). Sono coinvolti in processi come la germinazione dei semi (Nojavan-Asghari & Ishizawa, 1998), la moltiplicazione cellulare (Ueda & Kato, 1982) e lo sviluppo di radici primarie e secondarie (Staswick e coll., 1992), la fioritura (Albrechtova' & Ullmann, 1994), la formazione di gomma (Saniewski e coll., 1998) e la senescenza (Ueda & Kato, 1980). Sono coinvolti nella risposta della pianta ad attacchi di insetti/patogeni, in seguito a ferita e deficit idrico (Creelman & Mullet, 1995; Wasternack & Parthier, 1997; Seo e coll., 2001; Rakwal e coll., 2002). Essi inducono una serie di risposte di difesa che possono essere dirette (sintesi di proteine e piccole molecole, come gli alcaloidi) ed indirette (composti volatili, nettare extrafioreale). Tra le proteine di difesa indotte da JA si hanno inibitori di proteasi (che inibiscono le proteasi patogene), leucina aminopeptidasi e treonina deaminasi (TD) (Wasternack, 2007; Schaller & Stintzi, 2009; Wasternack & Kombrink, 2010). Le TD in particolare sono implicate nelle prime fasi di biosintesi di isoleucina e possono essere quindi utilizzate sia come fattori antinutrizionali, interferendo con i processi digestivi di animali erbivori, che nella sintesi di JA-Ile (Chen e coll., 2004; Chen e coll., 2005; Kang e coll., 2006). Nonostante l'acido jasmonico ed i suoi derivati siano considerati ormoni chiave nel meccanismo di risposta a stress, anche il suo precursore OPDA sembra giocare un ruolo importante e complementare nell'attivazione di un segnale di difesa (Stinzi e coll., 2001; Li e coll., 2005). OPDA è un più forte induttore di sintesi di fitoalessine in colture cellulari di *Glycine max* rispetto al JA (Fliegmann e coll., 2003); in *Arabidopsis* inoltre un rapido incremento di JA-Ile nelle foglie è correlato con una brusca diminuzione di OPDA in seguito ad infezione, suggerendo quindi un ruolo di controllo per OPDA nella sintesi di acido jasmonico (Koo e coll., 2009).

E' stato riportato che i livelli endogeni di jasmonati aumentano in seguito ad esposizione a patogeni, così come somministrazioni esterne di jasmonati inducono geni correlati a stress o ad attacchi da patogeno (Mei e coll., 2006). Tuttavia, mentre il ruolo dei jasmonati in risposta a stress biotico è stato ampiamente documentato, veramente poco si conosce circa il loro coinvolgimento in risposta a stress di tipo abiotico. I livelli di jasmonati aumentano in soia (*Glicine max*; Creelman & Mullet, 1995) e *Pinus pinaster* (Pedranzani e coll., 2007) quando la pianta è sottoposta a siccità; in pomodoro (*Solanom lycopersicum*; Pedranzani e coll., 2003) e *Iris hexagona* (Wang e coll., 2001) sotto stress salino. In riso, sia la siccità che l'eccessiva salinità incrementano i livelli di jasmonati in foglie e radici, portando all'induzione di geni correlati a stress e implicati nella biosintesi di JA (Moons e coll., 1997; Kiribuchi e coll. 2005; Tani e coll., 2008).

L'interazione di acido jasmonico e degli altri jasmonati-coniugati (JA-Ile) con l'elemento COI1 (*CORONATIN-INSENSITIVE 1*) del complesso SCF^{coi1} (SCF, *Skp/Cullin/F-box*) e con un serie di proteine JAZ (*Jasmonate Acid ZIM-domain*) è alla base del meccanismo di attivazione dei geni responsivi all'acido jasmonico. Le proteine JAZ sono repressori di tali geni: la loro porzione C-terminale interagisce con una serie di fattori di trascrizione tra cui MYC2, coinvolto nel *signaling* dello jasmonato. L'interazione del JA con il complesso COI1-JAZ, ne provoca l'ubiquitinazione e quindi la degradazione (Fig. 1.5). La rimozione della proteina JAZ porta alla liberazione di MYC2 e quindi all'attivazione dei geni indotti dall'acido jasmonico (Chini e coll., 2007; Thines e coll., 2007; Katsir e coll., 2008; Fonseca e coll., 2009; Ellinger e coll., 2010).

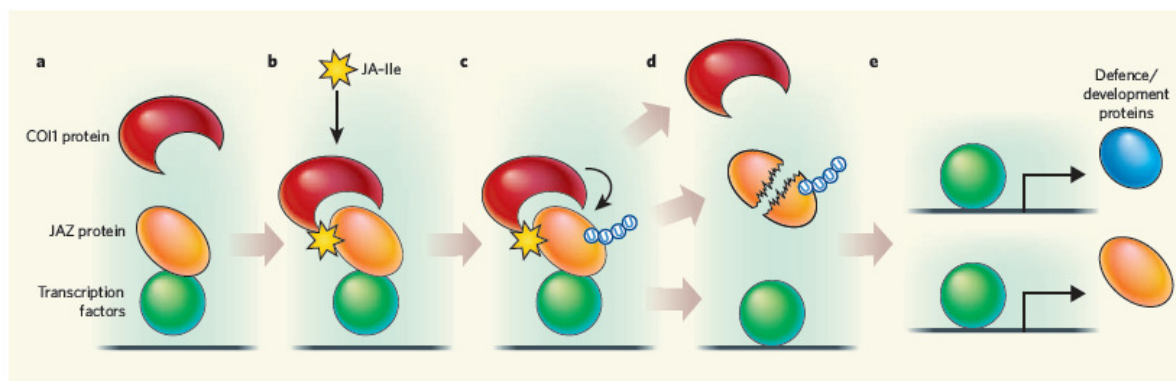


Figura 1.5 I cinque passaggi del *signaling* dell'acido jasmonico. **a.** Le proteine JAZ sono normalmente legate ai fattori di trascrizione ed inibiscono la loro attività. **b.** In risposta a stress JA-Ile (indicata come una stella) stabilizza il legame tra COI1 e JAZ. **c.** La proteina JAZ è quindi modificata da ubiquitine, che la degradano (**d.**). **e.** i fattori di trascrizione sono liberi di agire ed attivare la trascrizione dei geni (Farmer, 2007).

E' stato suggerito un sistema a *feedback* positivo, che potrebbe portare alla sintesi di nuovo JA a seguito dell'attivazione di MYC2 (Fig. 1.6a). I danni meccanici infatti provocano un rapido (5 minuti) e considerevole (circa di 25 volte) incremento di JA e JA-Ile nel punto di ferita (Koo e coll., 2009; Koo & Howe, 2009). Tuttavia, l'incremento sistemico di JA-Ile precede l'attivazione dei geni responsivi al JA. L'accumulo di JA-Ile potrebbe quindi derivare da una sua sintesi *de-novo*, come riportato da recenti lavori in foglie distali di *Arabidopsis* ed in *N. attenuata* (Wang e coll., 2008; Koo e coll., 2009), oppure da un suo trasporto a partire dalle zone danneggiate.

Tuttavia, la natura transiente del segnale implica la presenza di efficienti meccanismi di attenuazione/inattivazione del segnale, come ad esempio la conversione di JA e JA-Ile in molecole inattive o meno attive (Fonseca e coll., 2009; Koo & Howe, 2009; Wasternack &

Kombrink, 2010), oppure la presenza di un sistema di regolazione che potrebbe supportare una sintesi, indotta dalla sovra-espressione di JA, di nuove proteine JAZ che agirebbero quindi da repressori per MYC2 (Fig. 1.6b) (Chini e coll., 2007). In *Arabidopsis* jasmonoil-isoleucina si accumula in maniera differente in foglie ferite e non. Nelle porzioni ferite, i livelli di JA-Ile sono molto alti (circa 10 volte in più) e persistono per più tempo (almeno 6 ore). Tuttavia, a tempi lunghi i livelli di espressione dei geni implicati nella biosintesi di JA sono veramente bassi, suggerendo quindi una possibile perdita di sensibilizzazione, dovuta ad un meccanismo di *feedback* negativo (Koo e coll., 2009).

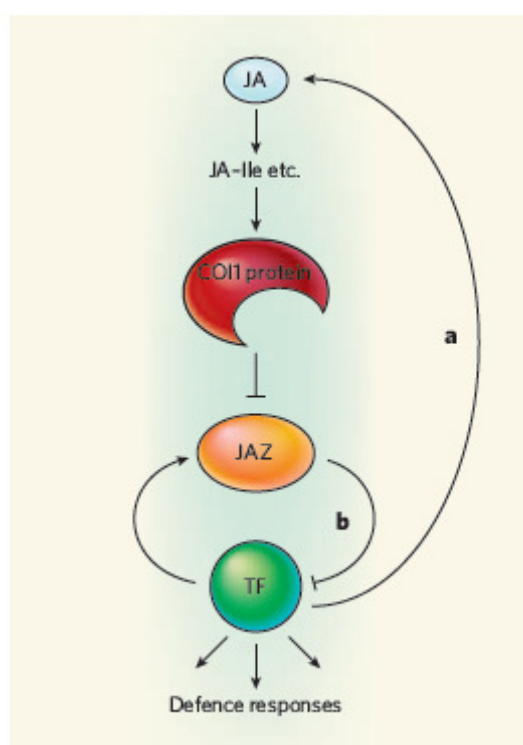


Figura 1.6 La sintesi di acido jasmonico (JA) è controllata da un sistema a *feedback* positivo (a). Un secondo sistema di regolazione (b) prevede un *feedback* negativo. Il sistema potrebbe essere ulteriormente complesso per l'interazione delle proteine JAZ con repressori trascrizionali. In un ulteriore circuito, non illustrato, MYC2 potrebbe reprimere la sintesi dei suoi stessi trascritti (Farmer, 2007).

In accordo con questi dati, è stato proposto un modello basato sulla rapida diffusione del segnale (sia fisico che chimico) per l'attivazione della biosintesi di JA e JA-Ile.

L'acido jasmonico ed il suo metil-coniugato (MeJA) sono molecole mobili che possono essere trasportate attraverso il sistema vascolare (Zhang & Baldwin, 1997; Schilmiller & Howe, 2005;

Wasternack e coll., 2006; Thorpe e coll., 2007). MeJA può inoltre funzionare da segnale volatile per la comunicazione tra le zone danneggiate ed i tessuti integri (Heil & Ton, 2008).

Inoltre, assieme con i jasmonati, segnali fisici (potenziali elettrici e forze idrauliche) sembrano essere implicati nella rapida trasmissione del segnale all'interno della pianta (Malone & Alarcon, 1995).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi di dottorato è quello di indagare sul possibile coinvolgimento del metabolismo delle ossilipine nella risposta delle leguminose agli stress di tipo abiotici, quali siccità e salinità del terreno. Le basi fisiologiche della risposta della pianta a questi due stress infatti si sovrappongono.

A tal fine, sono state prese in considerazione due specie: la leguminosa modello *Medicago truncatula* e la specie di interesse agronomico *Cicer arietinum*, sottoposte a stress salino e carenza idrica rispettivamente.

- Analisi HPLC sono state quindi condotte su piante di *M. truncatula* sottoposte a diversi tempi di stress salino per verificare i livelli di accumulo delle principali ossilipine e degli ormoni ABA e SA in radice, fusto e foglie.
- Regioni altamente conservate di quattro geni chiave del metabolismo delle ossilipine (*lox*, *hpl*, *aos* e *aoc*) sono state prese in considerazione per produrre plasmidi ricombinanti utilizzati in esperimenti di silenziamento genico a livello radicale in plantule di *Medicago truncatula* (cultivar Jemalong A17), cresciute in presenza e in assenza di sale, ed analizzare il coinvolgimento di tali geni nella risposta allo stress.
- Analisi di espressione genica sono state condotte su radici di cece sottoposte a diversi tempi di siccità.
- Analisi HPLC sono state effettuate per quantificare le principali ossilipine prodotte nelle radici di cece sottoposte a stress idrico; i livelli di ossilipine sono stati quindi correlati con quelli di ABA.
- In ultimo, uno studio della localizzazione cellulare dei principali enzimi del *pathway* delle ossilipine è stato condotto per verificare la disponibilità di substrato per l'attività catalitica dei vari enzimi operanti in una via biosintetica complessa come quello delle ossilipine vegetali.

MATERIALI E METODI

3. MATERIALI E METODI

In questo lavoro di dottorato, ci si propone di analizzare il coinvolgimento di una particolare classe di composti, le ossilipine, nella risposta della pianta a due stress abiotici (la carenza di acqua e la salinità del suolo). Le specie vegetali utilizzate a tale scopo sono la leguminosa modello *Medicago truncatula*, su cui sono stati condotti gli esperimenti di stress salino, ed il cece (*Cicer arietinum*), una specie di interesse agronomico impiegato invece nello stress idrico.

3.1 ESPERIMENTI SULLO STRESS SALINO

Il lavoro svolto su *M. truncatula* è stato condotto tra il CNR-ISPA di Lecce, in cui è stato possibile realizzare i plasmidi ricombinanti necessari a silenziare i geni oggetto di studio, e l'Institut des Sciences Végétales (ISV) del CNRS di Gif sur Yvette (Francia) dove è stato svolto il lavoro su pianta.

Le ESTs (*Expressed Sequence Tags*) dei geni lipossigenasi, idroperossido liasi, allene ossido sintasi e allene ossido ciclastasi di *M. truncatula* sono state prese dalla banca dati DFCI-Plant Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>), inserendo i seguenti TCs (*Tentative Consensus sequences*) per i geni: *lox* (TC100141) *hpl* (TC107037) *aos* (TC101097) *aoc* (TC97780).

Per la ricerca delle sequenze è stato utilizzato il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) che permette l'analisi comparativa tra una specifica sequenza (nucleotidica o aminoacidica) e quelle depositate nelle banche dati.

La determinazione dell'omologia tra sequenze nucleotidiche è stata effettuata mediante il programma Clustal W (www.ebi.ac.uk) che permette l'allineamento tra due o più sequenze.

3.1.1 PRODUZIONE DI PLASMIDI RICOMBINANTI

3.1.1.1 Strategia di clonaggio per ottenere plasmidi necessari a silenziare geni

I costrutti necessari a silenziare i quattro geni chiave del metabolismo delle ossilipine sono stati ottenuti con l'utilizzo della Tecnologia *Gateway* (Invitrogen, USA) che consente di clonare in modo rapido sequenze di DNA in un vettore di partenza, denominato *entry clone*, e successivamente in vettori d'espressione, conservandone l'orientamento ed il modulo di lettura. La Tecnologia *Gateway* è un sistema di clonaggio altamente efficiente che sfrutta il principio di ricombinazione sito-specifica utilizzato dal fago *Lambda* nell'integrazione e scissione del suo genoma in *E. coli*. La ricombinazione avviene a livello di specifiche sequenze denominate *att*, note come *attB* in *E. coli* e *attP* nel fago *Lambda*. Queste sequenze sono state ben caratterizzate

(Weisberg & Landy, 1983) e sono riconosciute e legate da proteine che regolano il passaggio dal ciclo litico a quello lisogeno del fago (Landy, 1989; Ptasne, 1992). Dopo ricombinazione vengono costituite delle sequenze ibride derivate da *attB* e *attP*. In particolare due reazioni di ricombinazione rappresentano la base della Tecnologia *Gateway*:

- *BP reaction*: è una reazione di ricombinazione tra prodotti di PCR, che presentano sequenze *attB* alle due estremità, e un vettore caratterizzato da sequenze *attP* all'estremità del gene *ccdB*. Il vettore risultante prende il nome di *entry clone*.

Il gene *ccdB* codifica per una proteina che interferisce con l'enzima DNA-girasi di *E. coli* inibendo la crescita di molti ceppi. La presenza di *ccdB* consente pertanto una selezione negativa: se la ricombinazione avviene, il gene *ccdB* viene sostituito dal gene d'interesse e cellule trasformate con questo costrutto saranno in grado di crescere su un opportuno terreno, mentre non si avrà crescita per quelle cellule trasformate con il vettore non ricombinante.

- *LR reaction*: è una reazione di ricombinazione tra un *entry clone* caratterizzato da sequenze *attL* e un vettore (*destination vector*) che presenta il gene *ccdB* clonato tra sequenze *attR*.

Quattro coppie di primer opportunamente disegnati in regioni altamente conservate dei geni *lox*, *hpl*, *aos* e *aoc* di *M. truncatula* (Fig. 3.1) sono state utilizzate per amplificare da ciascun gene frammenti di circa 200 pb, recanti all'estremità 5' terminale una coda di quattro nucleotidi (CACC-) necessaria al suo inserimento in modo direzionale nel vettore di clonaggio pENTR/D-TOPO (pENTR Directional TOPO Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, USA).

A Lipxygenase (Mt-TC100141)

GCACGAGCTTAACTTCACTTATCTCAATCAAAATCATTCAAGATGTTTCCCTTTTCAAGAAGAAGCAAAAGATTAA
GGGAACAGTGGTGTGATGTGCAAGAATGCATTGGATTTGAATGATATTAAAGCTGGCCCTTCACTTGGAGCTGGAT
TTGGTCTTGTAGAGACGTTGTTGGTGGTGTGCTATTGATGGTGTCTACTGCTATCTTAGGCCGTAGTGTGGCCTCCAG
TTGATCAGTGCCACCAAACTGACAGAATGGGAAATGGGTTTGTGGAGATCAGTTCCTTCTGGAGAAACGTATTCC
TTTTTTACCAACCTTGGCAGCAAGACAAGATGCATTCAAGTGTATTTTGAATGGGATAATGATTTTGAATACCAG
GTGCATTTTACATTAAAAATTATACACAAGGTGAGTTCTACCTTGTGAGTTTAACTCTTGAAGACATACCTGGTTCAT
GATTCCATTACATTTCTTTGCAACTCATGGGTTTACAATGCTAAACAATATCGCAAGGACCGAATTTTCTTTGCCAA
TAAGCCATACCTTCCACATGAAATGCCAGCTCCACTAGTTAACTACAGACATGTAGAATTGGATACTTTAAGGGGAG
ATGGAACAGCAAAGCGTGAGGAATGGGACAGAATCTATGATTATGATGTTTACAATGATTTGGGAAATCCAGATAAG
AGTCGAGACCTTGCTCGTCCGATTCTCGGAGGTTCTTCTAAATTTCCCTATCCTCGTAGGGGAAGAACCTGCAGAAA
ACCGACCAAAACAGATTCTGCGAGTGAGAGACCAGCAACTGATACTAACTATGTCCCAAGAGATGAAGTTTTTGGTC
ACTTGAAGCAAGCTGACTTCCCTTGGATTTGGATTGAAAGGTTTAAATCAAAATGTGATACCTAAATTTGCAATTTT
TTTGACTTCGACAAAGAGTTTGATAATTTGGAAGAAGTTCGTTGCCTCTTCAAGGAGGAGTTAAGCTACCGACAGA
TATCATCAGTGCTATTAGTCCCATAGCAATGGTGAAGGAAATCTTCCGAAGTATGGTGAAAAATTTCTCAAGTATC
CACCTCCCCATGTCATTCAAGCTGATAAGTCTGCATGGATGACTGATGAAGAATTTGCAAGAGAAAATGCTTGCTGGT
GTAAATCCATGTGTGATTCAAAGACTTCAAGTGTTCACCCGAAAGCAAGCTAGATCCCAATGTCTATGGAGATCA
AACTAGTACAATAACAAAAGAACACTTGGAGATTAACACGGATGGACTCACAGTAGAAAAAGGCAATTCAAGACGAGA
GGCTATTCAATTTGGATTACCATGACGCATTTCATGTCATACTTGAAGTATATAAAACAAACCTATTCCAAAAGTCTTAT
GCCACTAGGACAATCCTATTCTTGAAGATGATGGGACTTTAAAGCCATTGGCCATCGAACTAAGTTTGCCACACCC
AGATGGCGAAAAATATGGAGCTGTGAGTAAAGTGCTGTTGCCTCCAGAAGGACATGGTGTCAAAGAACAATTTGGC
AATTGGCCAAGGCGTATGTAGTTGTAAATGACGCCTGCTTTCACCAACTCATGAGTCACTGGTTGAATACACATTGC
GTGATTGAGCCATTTCATCATAGCTACAAATAGGTGTCTCAGTGTGGTTCATCCTATTTCATAAGCTTCTACAGCCTCA
CTATCGTGACACAATGAATATCAATGCATTGCTCGGAGTTTATTGATCAGTGGAGGTGGCATTATAGAGCAAGCAT
TTTTGCCAGGACCGTACGCTGTTGAGATGTCTGCTGAGTTTACAAGGATTGGGTTTTTCTTGACCAAGCACTACCT
GCTGATCTTATCAAGAGAGGAATGGCTGTTTCAGGATGCCAGTGCACCCACGGACTTCGCCTAGTGATAAAAGACTA
CCCTTTTGCTGTTGATGGATTAGAGATATGGGATGCTATTAAGGCATGGGTGAAAGACTATGTTAGTTTGTACTACA
AGACAGACGTGGCCATTCAAAGAGATGCTGAGCTCCAAGAGTTTTGGAAAGAAGTCGTAGAGATCGGTCATGGTGAT
CATAAAATAAGCCTTGGTGGCCTGAGATGAATTCGATTAAACGAGTTGGTGGAATCCTGCTCAATAATCATATGGCT
TGCATCCGCTTTCCACGCAGCTGTCAATTTGCGACAATATCCTTACGGTGGTTTAACTTGAACCGACCAACTATGA
CAAGGAGGTTAATTCCTGAAAAGGGAACCAAGAATATGAAGAGATGGAGAAAGATGACCAAGGGCTTATTTGAGA
ACAATCACACCAAAGACCGAGGCTCTCATTGACCTTACGGTGATAGAGATATTGTCAAGGCATGCTTCTGATGAAGT
TTACTTAGGGAAAAGAGAGAATGATGAATGGACAGCAGATGAAAAGGCAAGAGTAGCCTTCAAAAAGGTTTGCAAAGA
AGATGGAAGACATCGAGAAAAAAATTGAAAGCAGAAAACAAAGAACAGATTTGCTTAACCGAACTGGCCCCGGTTAAG
ATGCCCTACACTTTGCTTTTACCTACCAGTGGAGAAGGCTTGACTTGCAGAGGAATTCCCAATAGTGTCTTCTATCTA
AGGATCTCTTTAAGCTACCCTACAAGTATTGTTGCTGCAACTTTCAATAAAATACATAGATGAGACTGATCTTGTCT
ATGTACATATATGTTTGTGTTGTTAATCAAATGTTGTATTTTGGTGTCTAGAGTCTGGTTTTCTTTTTCTGTAACT
CAAATAACACATGCATAGATGAACATTGGTTTATTTATGCATGAATGTCCTGTTTATGATCAAATAAGTGTGATTTA
TCATAGTTAAGTATTTCTCTTANAAANANANNAANNNNANTNNAACTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTTCNCC
TATAGNG

B Hydroperoxidelyase (Mt-TC107037)

CTTTAAATCCGATCAAATGAAGTCTCATTCTCACTTTTGAAAACAACCTATAGTTATTACAAGCAAGTTCAGCCAT
 CTTTGGACAAACACAAACCACTCCAACAATGGCTTCCTCATCAGAAACCTCCTCAACCAACCTCCCTTGAAACCA
 ATCCCAGGAAGCTACGGTCTTCCCATCATCGGACCCCTCCATGACAGACATGACTACTTCTACAACCAAGGACGTGA
 CAAATACTTCCAAACCAGAATCGAAAAATACAACCTCCACTGTCTCAAACCTCAACATGCCACCAGGTGGTTTCATCG
 CTCCAGACCCAAAAGTCATCGCTCTTCTCGACGGTGCTTCTTCCCCATCCTCTTCGACAACGCCAAAAGTCGAAAAA
 CGTGACGTCTCGACGGTACTTTCATGCCTTCCACTGATTCTTCGGTGGTTACCGTACCTGTGCTTTTCAAGATAC
 AGCTGAACCTTCCCATAGCTCCTCAAACGCTTCATCTTCCACATCCTTTCATCAAAAACACGACACTTTCATTCCAC
 TCTTTCAAACTAACCTAACTGAACATTTACCGATCTTGAAAAAGAACTCGCTGGAAAAACATCAAAAAGCTAGCTTC
 AACACTTCCATTGGAGGCATAACCTTCAACTTCTCTTCAAACCTCATCACTGACAAAAACCTAGCGAAAACCTAAAT
 TGGTGAATCTGGTCCAACCTAGTTCAAACATGGCTTGACGCTCAGCTAGCTCCTTTAGCTACAGCTGGTTTACCAA
 AAATCTTCAACTACCTTGAAGATGTTCTCATCAGAACTATTCCGATCCCGCATGGACAGTGAAGTCTAGCTACAAT
 AAATCTACGAAGGTTAATGGAAGCTGGAACAACCTGTACTTGATGAAGCTGAAAAAATGGGCATAAAAAAGAGAAGA
 AGCTTGTACACAACCTTGTCTTACGTTAGGGTTCAACGCTTTTGGTGGTTTAAACAAACAGTTTCCGATCTTGATCA
 AGTGGGTTGGATTAGCTGGTGTGATCTACACAAAAAAGCTTGTGATGAAATCAGGGCTATTGTTAGAGAAGAAGGT
 GGGGTGAATTTATATGCGTTGGATAAGATGACTTTGACTAAATCAACGGTGTATGAAGCTTTAAGAATTGAACCTGC
 TGTTCCATATCAATATGCTAAAGCTAGGGAGGATCTAGTGGTGCA
 GAGCCATGATGCATCTTTTGAGATCAAGAAAGGTGAAATGATCTTTGGATATCAACCGTTCGCTACAAAAGATGCTA
 AGATCTTTGACAAACCTGAGGATTTTATTGCTGAGAGGTTTATTGGCGATGGAGAGAAGCTGTTGAAACATGTGTTT
 TGGTCCAATGGACGTGAGACTGATGAGGCTACACCTGATAATAAAATCTGTCTGCTAAGAATCTGGTGGTGCTCTT
 GTGTAGGTTGTATTTGGTGGAAATCTTCTTGAATTATGATACTTTTACCTTTGATTTTAAACCATCTGTTTTGGGTC
 CCCTATTACCATCAAGTCACCTTGTAAAGGCTTCATCCACCGTCTGATCAGTGATCATCATTGATCCTTACAAGACC
 TACCTGCATTTCTATGGATTGAGTAATGTTTTTATGTTATGTTAATGTTAATCATGTAGTTACATTAAATAAAGT
 TCTTTTTCTGGGTGGAACTGCACCTATTGGTATTGGAAGGATCGCTGGGTTTGTTTAATTTATTTATGCTTTGTG
 TGTGACTGCTATTTATTTATATTTTGCAGAGTGACATGTTTACATTATGTTTACTAAATGTTTTCTGAAACTTTT
 TTTATCAGAAAAACGAGCATTTCACTCAAGATTTTTTGGACGAAATTATCATCTCAACTAATATTTTCAAGTTACTATT
 GCCAAGTTACTCACAACATTTTTTTTTTGTCTATGCAAATTTTAGAGTGAAAAATATTAGACCCTGTAATTTTCAAGTAG
 ACATTTTCACTTGCTGCTCACTTGCTGCACTAGACTAGATAGTACTATTACTGACAAGCAATGGGGCCAAGTTTGTAG
 AACTCCATTTATGTCATTGTTATGCTTTTCTGGAACACGGC

C Allene Oxide Synthase (Mt-TC101097)

ACAATTTAATATTCTATAAATATCAACACCACCTTCTCACAACTCAACTACTATCTACACCACCATCACCATTTCAC
 CACCTCCAAGCATGGCTTCCTCTACTCTTTCAACTCCTTCTCCTAATCTCCTCAAACACCAAAACAGACCTCTTCC
 ACCACCTCATCAGACGTTTCTCCACCTTTCTTCCACCTATAAGATCCTCAGTTTCAGAAAAACACCCTTCCAAGT
 CTCCATCTCTCAACCACAAACAACCAAACTTCCGATCCGTAATAATCCCTGGTGACTATGGCATCCCCATTTCATCCAAC
 CATACAAAGACCGTTTAGACTATTTCTACAACCAAGGTCGTGATGAATACTTCAAATCACGTATCCAAAAATACCAG
 TCAACTATCTTCCGCACTAACGTTCCACCTGGTCTTTTCATAGCTCAAAACCCCTAACGTTGTTGCTCTCTTGATGG
 CAAAAGCTTCCCGTCTCTTTCGACGCATCGAAGATCGATAAAACCGATGTATTCACAGGTACATACACACCTTCTA
 CAGAACTCACTGGTGGTTATAGAGTTTTATCTTACCTTGATCCTTCTGAACCAAAACATGAACAGCTCAAGAAGTTG
 ATGTTTTTTCTCCTTAAATCACGTAGCCGTCATGTTATTCAGAGTTTCAGTCATGTTACAGAGAGTTTTTAAATGC
 TTTGAAAATCAACTTGCTGAAAATGGTCACGCTAGTTTGTGATAATAATGATCAAGCTGCATTTAATTTCTTGA
 ACCGTGCTTTGTTGGTGTTAACCTGTGGACACCGAAGTTGGACTTGACGGTCCAAAAATGGTTTCAGAAATGGGTT
 TTGTTTCAGTTAGGTCCAGTTTTGAAACTGGGCCTACCGAAATTTGTGGAAGATTCTATGATACATAATTTTCTGCT
 ACCATTTCCGGCTCATTAAAGAAAGATTACCAAAGACTTTATGATTTCTTTTATGCTTCCTCGGGATTGCTCTTGAGG
 AAGCAGAGCGTTTGGATGTTTCAAAGAGGAGGCTTGTGATAATCTATTATTCGCAACATGTTTTAATTCGTTTGGC
 GGGATGAAGCTGTTTTTCCCTAATTTGATGAAATGGATCGGGCGCGGTGGAGTGAGGTTGCATACAAAATTAGCAAC
 GGAATTTAGAGAGGCAGTAAGATCTGCTGGCGGGGAAATTACTATGGCGGCCATGGAGAATATGCCGTTGATGAAAT
 CGGTGGTATACGAAGCTTTTTCGTATTGATCCACCGGTTCCATTACAATTTGGAAGAGCAAAAAGGGATATGGTGATT
 GAAAATCATGAGAATGGTTTTTTAGTTAAGAAAGGTGAATTGTTGTTAGGATATCAACCTTTTGCTACTAAAGATCC
 TAAGATTTTTGAAAGAGCTGAGGAATTTGTTGCAGATAGATTTGTTGGTGATGAAGGTGAGAAATGTTTGAAACATG
 TGCTTTGGTCTAATGGACCAGAATCTCAATCTCCAAGTGTGGGAATAAACAATGTGCTGGTAAAGATTTCAACCACA
 TTGATTTCAAGACTTTTGGTTGTTGAACTTTTTCTTAGGTATGATTCCTTTGAGATTCAAGTTGGAAATTCACCTTT
 AGGTCCTTCTATTACCCTCACTTCTCTAAAGAGATCAAGCTTCTAATTTTTTAACAACTTTTTGGATTTTTTTTAGTG
 AGTAGTTATAAGATGATTGTTATTGTAATGTTGTAACTAGTATGTCTTGATTTTCAATTAATGTTGATATTTAAGTG
 TAGTTTTTTGGATGGATACTAGATATTGTTGTACTTGTACACGTGGATTGGATCTTTAATTAGTAGTTGTTGGTGGG
 TGATCAATCATGCACTATAGCAGTAATGGTGGCCTTGATAAAGGAATGTAAGTCCACTCCATTAAGGATTGTTTAAAT
 GTATGAGGCTTGAAATTGAAACAAATTGTACTATATGGAGTTAGATTTTTTATCAATAAAATGATAGTAATTTATGA
 TGGGAATGCATGATACACGGTGGTAATTTTCAATTTTTGTTGATAGACGTGTATACTTTTTTCATGAC

D Allene Oxide Cyclase (Mt-TC97780)

ATGGCCTCTTCAAGCTATGCTTTGAGAACTATTCCATCTTCCTTTGTTAAACCAACTGCTTTTGCCACCACCCCAAG
 ATCCTTTCTCACCCCTCATCTGCTTTTACACCCCTTCACTTCATCAAAGAACCTAAAGATGAACGCTGCATTCTCAA
 AATCTTGCTTTTCTTCAAGTGCCTATGAAATCTTTTACTTGCAAAAGCCAAGTAAATGAGTATGCTGACACTGAAAA
 GTTCAAGAAATGCATGTGTATGAGCTTAATGAGAGAGACCGTGGTAGCCAGCTTACTTGAGATTAAGCAATAAAAG
TGTCAATTCTCTTGGTGATTTGGTCCCCCTTTAGCAACAAATTATACACAGGAGATCTACAAAAACGTATTGGAATAA
CAACTGGTATTTGCATTTTAATCGAACACAAAGCTGAAAAGAAAAGGTGATAGATATGAAGCAATCTACAGTTTCCAT
TTTGGTGATTATGGTCACTTAGCAGTTCAAGGACCATATTTAACCTATCCTGAGGACACTTATCTAGCTGTGACTGG
 TGGTTCTGGAATATTTGAAGGTGTTAAGGGTCAAGTAAAGTTGCATCAAATTGTTTTCCATTCAAGATTTTCTATA
 CATTTTATTTGAGAGGTATTAAGGATTTGCCACAAGAGCTTCTTGGTAAGCATGTTGAGCCTTCTCCTGCTGTTGAA
 GCTTCTCCTGCTGCTAAGGCTCTTGAACCTCATGCTGTCATTGCTGGTTTTACATATTAG

Figura 3.1 Sequenze nucleotidiche TCs dei geni lipossigenasi (A) idroperossidi liasi (B), allene ossido sintasi (C) e allene ossido ciclastasi (D) sulle quali sono stati disegnati i primer (sottolineati) necessari all'amplificazione di regioni di circa 200 pb (in grigio) altamente conservate.

I primer utilizzati sono i seguenti:

- lox-for (5'-CACCAGGAATGGCTGTTTCAGGATGC-3')
- lox-rev (5'-GAATTCATCTCAGGCCACCAAGGC-3')

da cui si è ottenuto un frammento LOX di 253 pb;

- hpl-for (5'-CACCAGACTGATGAGGCTACACCTG-3')
- hpl-rev (5'-TCAGACGGTGGATGAAGCCTTAAC-3')

per il frammento HPL di 191 pb;

- aoc-for (5'-CACCAAGAAATGCATGTGTATGAGC-3')
- aoc-rev (5'-CTGCTAAGTGACCATAATCACC-3')

per AOC di 257 pb ed infine

- aos-for (5'-CACCATGGCTTCCTCTACTCTTTCAACTCC-3')
- aos-rev (5'-TGGGATGCCATAGTCACCAGGGA-3')

per il frammento AOS di 216 pb.

Per ottenere un *entry clone* per ciascun gene d'interesse (LOX, HPL, AOS e AOC), è stata effettuata una *Topo Cloning Reaction* che consente di trasferire il prodotto di PCR nel vettore di clonaggio. Ciascuna mix di reazione è stata quindi utilizzata per trasformare cellule competenti *E. coli* "One Shot TOP10" (Invitrogen, USA). Le cellule sono state quindi fatte crescere su terreno selettivo, contenente un antibiotico appropriato, e le colonie positive sono state identificate mediante PCR su colonia. Da queste quindi è stato estratto il DNA plasmidico utilizzato per confermare la presenza del frammento di DNA di interesse tramite sequenziamento ed allestire quindi una *LR Recombination reaction* che consente di trasferire tale frammento nel vettore pFRN (*destination vector*). Questo ultimo è un "vettore RNAi", costruito in modo da

poter silenziare il gene *target* poiché il cDNA viene clonato in due siti del plasmide con orientamento opposto, “senso” e “antisenso” (Fig. 3.2).

Tutta la reazione di ricombinazione è stata impiegata poi per trasformare cellule competenti *E. coli* “One Shot TOP10” (Invitrogen, USA); anche in questo caso le cellule cresciute su terreno selettivo sono state analizzate con PCR su colonia, per identificare le colonie positive, ed il DNA plasmidico estratto è stato amplificato con primer specifici per verificare il corretto orientamento degli inserti.

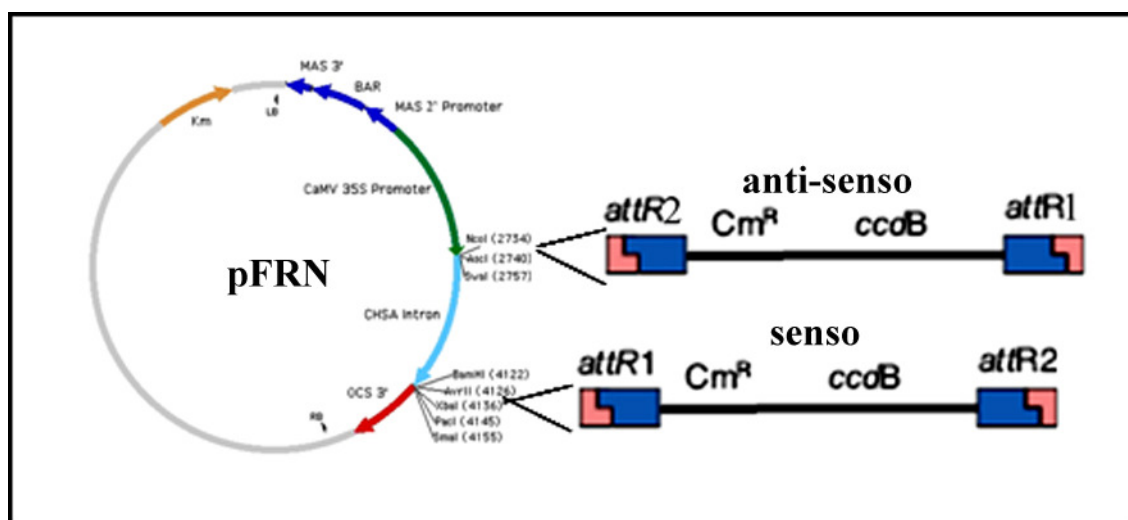


Figura 3.2 Rappresentazione schematica del vettore RNAi (pFRN) in cui il cDNA di interesse viene clonato in due siti del plasmide con orientamento opposto, “senso” e “antisenso”, grazie alla presenza di una combinazione di sequenze *attR*.

3.1.1.2 Materiale vegetale

Piantine di *M. truncatula* (genotipo Jemalong A17) controllo e sottoposte a stress salino (NaCl 100 mM) sono state fornite dall’Institut des Sciences Végétales (ISV) del CNRS di Gif sur Yvette (Francia) ed utilizzate per estrarre RNA totale dal tessuto radicale.

3.1.1.3 Estrazione di RNA

Le radici congelate, conservate a -80 °C, sono state omogeneizzate a freddo con azoto liquido ed utilizzata per l’estrazione di RNA totale utilizzando il kit “SV Total RNA Isolation System” (Promega, USA). Questo sistema di estrazione e di purificazione dell’RNA totale si basa sull’azione combinata delle proprietà distruttive e protettive della guanidina tiocianato (GTC) e

del β -mercaptoetanolo, per inattivare le ribonucleasi presenti negli estratti cellulari. La GTC in associazione con l'SDS (Sodio Dodecil Solfato), disgrega i complessi nucleoproteici e fa in modo che l'RNA venga rilasciato in soluzione. Infatti, la GTC posta a contatto con gli estratti cellulari provoca la precipitazione selettiva delle proteine cellulari e il rilascio dell'RNA in soluzione.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- la polvere posta in una provetta da 1,5 ml ed è stata risospesa in 175 μ l di “SV RNA Lysis Buffer”; in questa fase le cellule contenute nell'omogenato vengono lisate;
- sono stati aggiunti 350 μ l di “SV RNA Dilution Buffer” e le due soluzioni sono state rimescolate invertendo la provetta per alcune volte;
- mediante centrifugazione, il lisato è stato separato ed è stato trasferito in una nuova provetta, nella quale sono stati aggiunti 200 μ l di etanolo 95%;
- la soluzione è stata trasferita nello “Spin Basket”, una colonnina che contiene sul fondo una membrana di fibre di vetro in grado di legare l'RNA; mediante centrifugazione l'RNA è stato separato, rimanendo adeso alle fibre di vetro, mentre l'eluato è stato eliminato;
- dopo aver effettuato un lavaggio con 600 μ l di “SV RNA Wash Solution”, sulla membrana sono stati posti 50 μ l di “DNase incubation mix” allo scopo di degradare il DNA presente come contaminante della preparazione; la miscela di reazione è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente;
- la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 200 μ l di “SV DNase Stop Solution”;
- dopo centrifugazione ed eliminazione dell'eluato, l'RNA adeso alla membrana è stato sottoposto a due lavaggi con 600 μ l di “SV RNA Wash Solution”;
- l'RNA è stato eluito con 100 μ l di H₂O.

Tutte le centrifugazioni sono state fatte a 14000 x g.

L'acqua bidistillata e la vetreria usate per l'estrazione di RNA sono state trattate con una soluzione di DEPC 0,1% e successivamente sterilizzate. Il DEPC è un inibitore delle ribonucleasi e quindi previene la degradazione dell'RNA. Il materiale plastico è stato posto in autoclave a 121 °C e alla pressione di 1 atm per 40 min.

Dopo ogni estrazione 2 μ l di eluato sono stati utilizzati per la determinazione quantitativa, mediante spettrofluorimetro “NanoDrop” (Thermo Scientific, USA) ed altri 2 μ l sono stati utilizzati per controllare la qualità dell'RNA estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'RNA così preparato è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80 °C.

SV RNA Lysis Buffer (pH 7,5)

GTC	4 M
Tris	0,01 M
β -Mercaptoetanol	0,97%

SVDNase Stop Solution (pH 7,5)

GTC	2 M
Tris	0,004 M
Etanolo	57%

SV RNA Wash Solution (pH 7,5)

Acetato di potassio	0,06 M
Tris	0,01 M
Etanolo	60%

Yellow Core Buffer (pH 7.5)

Tris	0,0225 M
NaCl	1,125 M
“Yellow dye”	0,0025%

DNase Incubation Mix

“Yellow Core Buffer”	40 μ l
MnCl ₂ 0,09 M	5 μ l
DNase I (1 U/ μ l)	5 μ l

3.1.1.4 Sintesi di cDNA

Il cDNA è stato preparato a partire da 1 μ g di RNA totale, utilizzando come primer un oligo(dT) lungo 20 nucleotidi. Il volume finale di reazione era di 20 μ l in provette da 0,2 ml. Le reazioni sono state allestite come di seguito descritto, utilizzando i componenti forniti con il kit “Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen, USA).

Primer (50 μ M)	1 μ l
RNA (1 μ g)	X μ l
dNTP (10 mM)	2 μ l

H₂O trattata con DEPC fino a 12 μ l.

La reazione così preparata è stata incubata a 65 °C allo scopo di denaturare l'RNA ed i primer. Poi, sono stati aggiunti 10 µl di una miscela contenente:

<i>buffer</i> per la sintesi di cDNA (10X)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (ditiotreitolo) (0,1 M)	1 µl
“RNase OUT (40 U/µl)”	1 µl
H ₂ O trattata con DEPC	1 µl
“SuperScript III RT” (200 U/µl)	1 µl.

La reazione di sintesi è stata condotta a 50 °C per 50 minuti in un termociclatore “ONE Personal PCR System” (EuroClone, Italy) pre-riscaldato ed è stata fermata incubando per 5 minuti a 85 °C.

Le mix di reazione sono state quindi incubate 20 minuti a 37 °C con 1 µl di “RNAase H” (Invitrogen, USA) ed il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20 °C.

3.1.1.5 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le sequenze di interesse sono state amplificate utilizzando come stampo circa 50 ng di cDNA, in provette da 0,2 ml in un volume finale di 50 µl, secondo lo schema proposto dal kit “REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix” (Sigma-Aldrich, USA), utilizzando un volume equivalente a 10 µM di ogni primer.

L'amplificazione è stata condotta in un termociclatore “ONE Personal PCR System” (EuroClone, Italy) programmato nel seguente modo:

- denaturazione iniziale: 96 °C per 5 minuti
- 30 cicli:
 - denaturazione: 96 °C per 30 secondi
 - *annealing*: temperatura variabile a seconda della coppia di primer per 30 secondi
 - allungamento: 72 °C per 1 minuto
- allungamento finale: 72 °C per 15 minuti.

3.1.1.6 Analisi di frammenti nucleotidici: elettroforesi su gel

Il gel di agarosio all'1,5% è stato preparato sciogliendo a caldo 1,5 g di agarosio in 100 ml di tampone Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). A tale soluzione sono stati aggiunti 7 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml). Il gel è stato posto nell'apposita cella per elettroforesi, contenente il tampone

TAE 1X, collegata ad un alimentatore di corrente. I campioni da analizzare sono stati depositi nei pozzetti, dopo aver aggiunto il *Loading Buffer*. L'elettroforesi è stata condotta a 100 V costanti. Al termine della corsa elettroforetica, le dimensioni dei frammenti, visualizzati esponendo il gel ad una fonte di raggi UV, sono state determinate per confronto con un *marker* di peso molecolare, costituito da frammenti di DNA di dimensioni note (2-Log DNA Ladder /0,1–10,0 kb, BioLabs, USA).

Buffer di elettroforesi TAE (50X stock solution, pH 8,5)

Tris base	242 g
Acido acetico glaciale	57,1 ml
Na ₂ EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
H ₂ O sino ad 1 litro.	

Loading Buffer 6X

blu di bromofenolo 0,25%, xilene cianolo FF 0,25%, glicerolo 30%.

3.1.1.7 Eluizione dei frammenti da gel di agarosio

I frammenti di DNA di interesse, sono quindi stati recuperati dal gel utilizzando il kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”(Promega, USA), che prevede i seguenti passaggi:

- la banda di interesse è stata tagliata dal gel, ne è stato determinato il peso ed è stata posta in una provetta da 2 ml;
- sono stati aggiunti 10 µl di “Membrane Binding Solution” ogni 10 mg di gel, e la provetta è stata incubata a 55 °C, fino a sciogliere completamente l'agarosio;
- la soluzione è stata trasferita in un colonna “SV Minicolumn” ed incubata per 1 minuto a temperatura ambiente;
- il complesso “Minicolumn”-DNA è stato centrifugato per 1 minuto a 16000 x g e successivamente è stato eliminato l'eluato;
- dopo aver aggiunto 700 µl di “Membrane Wash Solution”, un primo lavaggio è stato condotto per 1 minuto a 16000 x g e successivamente è stato eliminato l'eluato;
- un secondo lavaggio è stato condotto con 500 µl di “Membrane Wash Solution”, nelle medesime condizioni per 5 minuti;
- dopo aver eliminato l'eluato, una centrifugazione di pochi secondi ha consentito di eliminare le tracce residue del tampone;
- il complesso “Minicolumn”-DNA è stato quindi trasferito in un nuovo tubo da 1,5 ml ed il DNA è stato quindi eluito con 30 µl di “Nuclease-Free Water”, dopo un incubazione di 1 minuto;

- dopo aver centrifugato (16000 x g) per 1 minuto è stato recuperato il DNA eluito.

Membrane Wash Solution (dopo aver aggiunto 75 ml etanolo 95%)

Acetato di potassio (pH 5,0)	10 mM
Etanolo	80%
EDTA (pH 8,0)	16,7 μ M

Membrane Binding Solution

Guanidina isotiocianato	4,5 M
Potassio acetato (pH 5,0)	0,5 M

3.1.1.8 Topo Cloning Reaction

La seguente reazione è stata allestita per clonare i prodotti di PCR (LOX, HPL, AOS ed AOC) nel vettore di clonaggio pENTR/D-TOPO (pENTR Directional TOPO Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, USA). Tale tipo di vettore permette di clonare in modo direzionale l'inserto di interesse in un *destination vector* grazie alla presenza di sequenze *attL* necessarie a tale ricombinazione.

La seguente mix di reazione è stata quindi incubata per 5 minuti a temperatura ambiente e poi posta in ghiaccio.

prodotto di PCR	2 μ l
soluzione salina	0,5 μ l
TOPO-vector	0,5 μ l
H ₂ O sino ad un volume finale di 3 μ l.	

3.1.1.9 Trasformazione di cellule competenti

Alle cellule competenti di *E. coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, USA) è stata aggiunta un'aliquota di DNA di interesse e la sospensione è stata mescolata delicatamente ed incubata in ghiaccio per 5-30 minuti; successivamente le cellule sono state sottoposte ad uno *shock* termico alla temperatura di 42 °C per 30 secondi e quindi poste in ghiaccio. Sono stati aggiunti 250 μ l di "S.O.C. Medium" (Invitrogen, USA) e la sospensione cellulare è stata incubata per 1 ora a 37 °C in agitazione (200 rpm). Le cellule sono state piastrate su terreno LB addizionato di kanamicina (50 mg/l) ed incubate a 37 °C O.N. (*Over Night*).

LB medium

“Bacto Tryptone” 10 g/l

“Yeast Extract” 5 g/l

NaCl 10 g/l

Per la preparazione di LB solido è stato aggiunto: Agar 7 g/l.

Tutti i terreni sono stati sterilizzati a 121 °C per 20 minuti in autoclave.

Kanamicina stock solution

Stock concentrati di antibiotico sono stati preparati in precedenza e sterilizzati per filtrazione. Per ottenere una soluzione *stock* di kanamicina (50 mg/ml), 50 mg di antibiotico sono stati disciolti in 100 µl di HCl e 900 µl di H₂O sterile. Le soluzioni sono state poi conservate a -20 °C.

3.1.1.10 PCR su colonia

Per l'analisi dei cloni positivi, alcune colonie sono state prelevate e inoculate in 50 µl di acqua sterile in provette da 0,2 ml. Il campione è stato incubato per 5 minuti a 95 °C per lisare le cellule e successivamente 15 µl di soluzione sono state utilizzate per allestire una reazione di PCR (vedi sopra) in un volume finale di 50 µl.

3.1.1.11 Estrazione di DNA plasmidico da cellule batteriche

La preparazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando il kit “Qiagen Plasmid mini kit” (Qiagen, Germania) che si basa sul metodo della lisi alcalina, secondo il seguente protocollo:

- incubare la colonia positiva in 3 ml di terreno LB contenente la richiesta selezione antibiotica in una provetta da 1,5 ml ed incubare a 37 °C in agitazione per 16 ore (150 rpm);
- Centrifugare a 15000 x g per 2 minuti e risospendere il *pellet* in 250 µl di “Buffer P1”;
- Aggiungere 250 µl di “Buffer P2” e mescolare gentilmente invertendo il tubo 5-6 volte;
- Aggiungere 350 µl di “Buffer N3” e mescolare gentilmente invertendo il tubo 5-6 volte;
- Centrifugare a 17000 x g per 10 minuti;
- Porre il sovranatante in una “QIAprep spin column” e centrifugare a 17000 x g per 1 minuto, eliminare l'eluato;
- Lavare la colonna con 750 µl di “Buffer PE” e centrifugare a 17000 x g per 1 minuto, eliminare l'eluato;
- Centrifugare a 17000 x g per 1 minuto, eliminare l'eluato;
- Porre la “QIAprep spin column” in un tubo da 1,5 ml ed fluire il DNA con 30 µl di acqua sterile.

I plasmidi ricombinanti sono stati conservati a -20 °C.

3.1.1.12 Analisi di sequenza

Per le reazioni di sequenza è stato utilizzato il “BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA) basato sulla metodica *dye terminator*.

Per ogni reazione di sequenza sono stati utilizzati:

DNA plasmidico	300 ng per reazione
primer (3,2 µM)	1 µl
“Ready Reaction Premix”	2 µl
“BigDye Sequencing Buffer”	4 µl
Acqua	sino a 20 µl

E’ stato applicato il seguente ciclo di reazione:

- denaturazione iniziale: - 96 °C per 2 minuti e 30 secondi;
- 25 cicli: - denaturazione: 96 °C per 10 secondi
- *annealing*: temperatura variabile a seconda del primer
- allungamento: 60 °C per 4 minuti.

Dopo purificazione su colonnine impaccate con resina Sephadex G-50, il DNA è analizzato mediante un sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, USA).

3.1.1.13 LR Recombination reaction

La seguente reazione è stata allestita per clonare i frammenti di cDNA (LOX, HPL, AOS ed AOC) nel *destination vector* pFRN (derivato dal vettore binario pFGC5941; NCBI *accession number* AY310901), mediante tecnologia *Gateway* (Invitrogen, USA).

Per una più efficiente ricombinazione, specifiche sequenze dei plasmidi ricombinanti “*gene-pENTR/D/TOPO*” sono state amplificate con i primer universali M13 *forward* e M13 *reverse* in modo da ottenere i frammenti di interesse fiancheggiato dalle sequenze *attL1* e *attL2*, necessarie alla ricombinazione con pFRN. I prodotti di PCR sono stati quindi analizzati su gel di agarosio, eluiti dal gel ed il DNA concentrato in 6 µl di acqua sterile con sodio acetato 3 M (pH 5,2).

In un tubo da 1,5 ml sono stati quindi aggiunti:

prodotto di PCR (attL1- <i>gene</i> -attL2)	6 µl
<i>destination vector</i> (pFRN) (150 ng)	1 µl
“LR ClonaseII enzyme mix”	0,5 µl
<i>buffer</i> TE (pH 8)	2 µl

la reazione è stata incubata a 25 °C per 1 ora e posta a contatto con 1 µl di *Proteinase K* (*Proteinase K* solution, Invitrogen, USA) per 10 minuti a 37 °C.

Cellule competenti di *E. coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, USA) sono state trasformate chimicamente mediante *shock* termico; le colonie positive sono state quindi selezionate su terreno contenente kanamicina (50 mg/l) ed il DNA plasmidico, estratto con “Qiagen Plasmid mini kit” (Qiagen, Germania), è stato analizzato mediante PCR e sottoposto a sequenziamento per verificare il corretto orientamento degli inserti.

I primer utilizzati sono i seguenti:

- CHSA-rev (5'-CTGACATGTGAAAATGAAAGC-3')
- CHSA-for (5'-CGATGGGCGCGCCCCATG-3')
- 35S (5'-ACTGACGTAA GGGATGACGCAC-3')
- OCS-rev (5'-CATGCGATCATAGGCGTCTC-3')
- M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')
- M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')

3.1.1.14 Digestione enzimatica di DNA

Il DNA plasmidico d'interesse (0,5-2 µg) è stato mescolato in un tubo da 1,5 ml con il tampone ed uno o più enzimi di restrizione rispettando i seguenti criteri:

- non più di 2U/µg in particolare nelle digestioni O.N., per evitare l'effetto STAR (Barany, 1988);
- meno di un decimo del volume totale della reazione, per evitare l'effetto d'inibizione causato dal glicerolo.

Il tutto poi è stato portato a volume con H₂O sterile ed incubato quindi a 37 °C per un tempo variabile da 1 a 18 ore.

3.1.2 GENE SILENCING IN PIANTA

I costrutti risultanti LOX/pFRN, HPL/pFRN, AOS/pFRN e AOC/pFRN, sono stati quindi utilizzati per trasformare il ceppo ARqual di *Agrobacterium rhizogenes*, le cui cellule sono state rese competenti chimicamente.

Una parte degli esperimenti di silenziamento sono stati condotti su piantine di *M. truncatula* (genotipo Jemalong A17) cresciute in condizioni sterili, l'altra parte su piantine infettate in vitro ma cresciute successivamente in serra.

3.1.2.1 Preparazione di cellule competenti *Agrobacterium rhizogenes* e trasformazione batterica

Cellule di *Agrobacterium rhizogenes*, ceppo ARqual (Quandt e coll., 1993) sono state rese competenti utilizzando la seguente procedura: singole colonie sono state inoculate in 100 ml di terreno TY arricchito di streptomicina (100 mg/l) e CaCl₂ (6 mM) e sono state fatte crescere a 28 °C in agitazione in beute da 250 ml finché la densità ottica (D.O.) a 600 nm non ha raggiunto il valore di 0,8. Le cellule sono state centrifugate per 10 minuti a 3000 x g e risospese in 50 ml di Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). Dopo un'ulteriore centrifugazione di 10 minuti a 3000 x g le cellule sono state risospese in 1 ml di TY e suddivise in aliquote da 100 µl in provette da 1,5 ml, congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C.

A 100 µl di cellule competenti sono stati aggiunti 0,2–1 µg del DNA plasmidico e la sospensione è stata mescolata delicatamente ed incubata in azoto liquido per 1 minuto; successivamente le cellule sono state poste a 37 °C per 30 minuti, nuovamente incubate in azoto liquido per 1 minuto ed a 37 °C per 30 minuti. 1 ml di TY addizionato di CaCl₂ (6 mM) è stato aggiunto al tubo e la sospensione cellulare è stata incubata per 3–6 ore a 28 °C in agitazione (200 rpm). Le cellule sono quindi state centrifugate a 3000 x g per 10 minuti ed il *pellet* risospeso in 100 µl di TY addizionato di CaCl₂ (6 mM). Le cellule sono state piastrate su terreno TY (agar 0,75%) arricchito di streptomicina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l) e CaCl₂ (6 mM) e incubate a 28 °C per due giorni al buio.

TY Medium (pH 7,5)

“Bacto-Tryptone”	8 g/l
“Bacto yeast extract”	5 g/l
NaCl	5 g/l

Streptomicina stock solution

Stock concentrati di antibiotico sono stati preparati in precedenza e sterilizzati per filtrazione. Per ottenere una soluzione *stock* di streptomicina (50 mg/ml), 100 mg di antibiotico sono stati disciolti in 1 ml di H₂O sterile. Le soluzioni sono state poi conservate a -20 °C.

3.1.2.2 Preparazione del DNA plasmidico da cellule di *Agrobacterium rhizogenes*

Per l'analisi dei cloni positivi sono state prelevate alcune colonie e sono state inoculate in 2 ml di terreno TY contenente la richiesta selezione antibiotica e CaCl₂ (6 mM), incubate a 28 °C in agitazione per 2 giorni e al buio. Il seguente protocollo è stato utilizzato per l'estrazione del DNA plasmidico:

- Centrifugare la sospensione batterica 5 minuti a 15000 x g;
- Risospendere il *pellet* in 200 µl di *GET solution* e porre in ghiaccio per 5 minuti;
- Aggiungere 400 µl di *NS solution*, mescolare gentilmente e porre in ghiaccio per 5 minuti;
- Aggiungere 300 µl di *KAC solution*, mescolare gentilmente e porre in ghiaccio per 5 minuti;
- Trasferire il sovranatante in un nuovo tubo da 1,5 ml ed aggiungere 600 µl di una soluzione cloroformio:metanolo (1:1), agitare con vortex e centrifugare per 5 minuti a 15000 x g;
- Trasferire il sovranatante in una nuova provetta e aggiungere 1 volume di isopropanolo, incubare per 2 minuti a temperatura ambiente e centrifugare per 5 minuti a 15000 x g;
- Aggiungere al *pellet* 1 ml di etanolo 70%, centrifugare per 5 minuti a 15000 x g e risospendere in 20 µl di acqua sterile.

Il DNA così preparato è stato conservato a -20 °C ed analizzato tramite PCR.

GET solution

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris (pH 8)	25 mM

NS solution

NaOH	0,2 N
SDS	1%

KAC solution

Potassio acetato	3 M
Acido acetico	11,5%

3.1.2.3 Sterilizzazione dei semi e condizioni di crescita

Semi di *M. truncatula* (Jemalong A17) sono stati scarificati in acido solforico concentrato e sterilizzati utilizzando il seguente protocollo (de Lorenzo e coll., 2007):

- circa 1,5 g di semi (all'incirca 300 semi) sono stati posti in un tubo da 50 ml con 5 volumi di acido solforico per 3 minuti in agitazione;
- i semi sono stati rimossi con l'ausilio di una spatola e, in un nuovo tubo sterile, lavati con acqua sterile per 4 volte;
- i semi sono stati quindi incubati per 17 minuti in agitazione in 35 ml di "Bayocllore" (Bayrol, Francia) e quindi lavati per 6 volte con acqua sterile;
- a seguito di un'ultima incubazione di 1-2 ore in acqua sterile in agitazione, i semi sono stati depositati su piastre contenenti *Fahraeus medium* (agar 1,5%), per 2 giorni a 4 °C e quindi una notte a 24 °C al buio per uniformare la germinazione.

Fahraeus medium (pH 6,5)

MgSO ₄	0,5 M
KH ₂ PO ₄	0,7 M
Na ₂ HPO ₄	0,4 M
Fe-EDTA	10 mM
MnSO ₄	1 mg/ml
CuSO ₄	1 mg/ml
ZnSO ₄	1 mg/ml
H ₃ BO ₃	1 mg/ml
NaMoO ₄	1 mg/ml

3.1.2.4 Trasformazione radicale con *Agrobacterium rhizogenes*

L'infezione radicale di piantine di *M. truncatula* è stata condotta come descritto da Boisson-Dernier e coll. (2001). I semi germinati, sono stati infettati utilizzando cellule di *Agrobacterium rhizogenes* ricombinanti (vedi sopra) fatte crescere per 2 giorni al buio su terreno TY (agar 0,75%) arricchito di streptomicina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l) e CaCl₂ (6 mM) a 28 °C.

Per ciascun plasmide pFRN ricombinante, il protocollo di infezione prevede i seguenti passaggi :

- le cellule batteriche sono state piastrate e fatte crescere come sopra indicato;
- ciascun seme germinato è stato delicatamente prelevato con una pinzetta sterile, i cotiledoni sono stati liberati dal tegumento e la radichetta è stata messa a contatto con le cellule di agrobatterio;

- le plantule infettate sono state quindi trasferite (16 per ogni piastra) su piastre quadrate (12 x 12 cm) contenenti *Fahraeus medium* (agar 1,5%) (Truchet e coll., 1985), addizionate di azoto (NH_4NO_3 1 mM), CaCl_2 (1 mM) e kanamicina (25 mg/l) selettiva per l'agrobatterio, inclinate a 45° e poste per una settimana a 20 °C con fotoperiodo luce-buio 18/6 ore e successivamente a 25 °C per un'altra settimana nelle stesse condizioni di luminosità.

3.1.2.5 Trattamenti e valutazione dello stress salino in vitro ed in serra

Per ciascun esperimento di silenziamento, una metà delle piante composite sono state fatte crescere in condizioni di stress salino (100 mM NaCl) ed una metà in condizioni controllo.

Per gli esperimenti condotti in condizioni sterili, le piantine sono state trasferite su *Fahraeus medium* (controllo) o *Fahraeus medium* NaCl 100 mM, senza azoto e senza antibiotico, su carta da filtro marrone (12 x 9 cm), per evitare la penetrazione delle radici nell'agar; quindi sono state fatte crescere per 8 giorni a 25 °C, con fotoperiodo luce-buio 18/6 ore, monitorando giornalmente la crescita radicale (Fig. 3.3).

Per le prove condotte in serra, le piantine sottoposte ad agroinfezione sono state trasferite in vasi 80 x 60 cm su terreno sintetico sabbia: perlite (1:3, peso/peso) ed innaffiate con *e-medium* ([Soluplant 18.6.26]:acqua 1:1, Duclos, Francia). Dopo 2 giorni, una metà delle piante è stata sottoposta a stress salino, innaffiandole con *e-medium*-NaCl 100 mM, mentre l'altra metà è stata innaffiata con la soluzione tal quale (controllo). Le piante sono state cresciute in serra con un fotoperiodo luce/buio di 18/6 ore, umidità relativa al 60%, ad una temperatura di 22 °C per 16 giorni ed innaffiate all'occorrenza con *e-medium*. Il sedicesimo giorno, le piante sono state collezionate e fotografate; alcune radici sono state congelate singolarmente a -80 °C, le altre piante invece sono state utilizzate per monitorare le differenze in crescita radicale e biomassa secca tra i campioni trattati e i controlli. Per ottenere una stima della biomassa secca, la radice e la parte aerea, sono state separate, poste in tubi sterili e incubate ad una temperatura di 55 °C in stufa per 2 giorni.

3.1.2.6 Real time RT-PCR

Le radici, collezionate e congelate, sono state omogeneizzate a freddo ed utilizzate per l'estrazione di RNA totale e la sintesi del cDNA come sopra descritto.

1 µl di cDNA è stato quindi amplificato utilizzando il kit "LC Fast-Start DNA Master SYBR Green I" (Roche Diagnostics, Francia) seguendo le indicazioni:

cDNA	1 µl
“FastStart Reaction Mix SYBR Green”	5 µl
Primer <i>forward</i>	2 µl
Primer <i>reverse</i>	2 µl.

I primer, opportunamente disegnati in regioni specifiche dei geni codificanti per gli enzimi *MtLOX*, *MtHPL*, *MtAOS* e *MtAOC*, sono i seguenti:

- LOX-for (5' - TTGCTGCAACTTTCAATAAAATACA -3')
- LOX-rev (5' - CCAATGTTCATCTATGCATGTGT -3')
- HPL-for (5' - AGGATCGCTGGGTTTGTTTA -3')
- HPL-rev (5' - AGCAAGTGAGCAGCAAGTGA -3')
- AOS -for (5' - GCAGTAATGGTGGCCTTGAT -3')
- AOS-rev (5' - CCACCGTGTATCATGCATTT -3')
- AOC-for (5' - GGATTTGCCACAAGAGCTTC -3')
- AOC-rev (5' - ACCAGCAATGACAGCATGAG -3')

Il gene *MtActin11* è stato utilizzato come gene costitutivo; la sintesi di tre indipendenti preparazioni di cDNA (replica strumentale) ha permesso di monitorare la riproducibilità dell'esperimento, mentre per ogni condizione di stress sono state utilizzate due repliche biologiche.

La reazione di sintesi è stata condotta in un “Light Cycler” (Roche, Francia) utilizzando le seguenti condizioni:

- denaturazione iniziale: 95 °C per 10 secondi;
- 50 cicli: 95 °C per 5 secondi,
- 60 °C per 5 secondi
- 72 °C per 15 secondi.

Ed i dati ottenuti elaborati a mezzo del programma annesso allo strumento.

3.1.2.7 Analisi statistica

Le lunghezze dell'apparato radicale sono state misurate con il programma informatico di elaborazione digitale delle immagini “ImageJ” (National Institutes of Health, USA). Le analisi statistiche dei dati ottenuti sono state sviluppate con il test di Kruskal e Wallis (Georgin & Gouet, 2000) e di Dunn-Sidak utilizzando il programma informatico XLSTAT (Microsoft, USA).

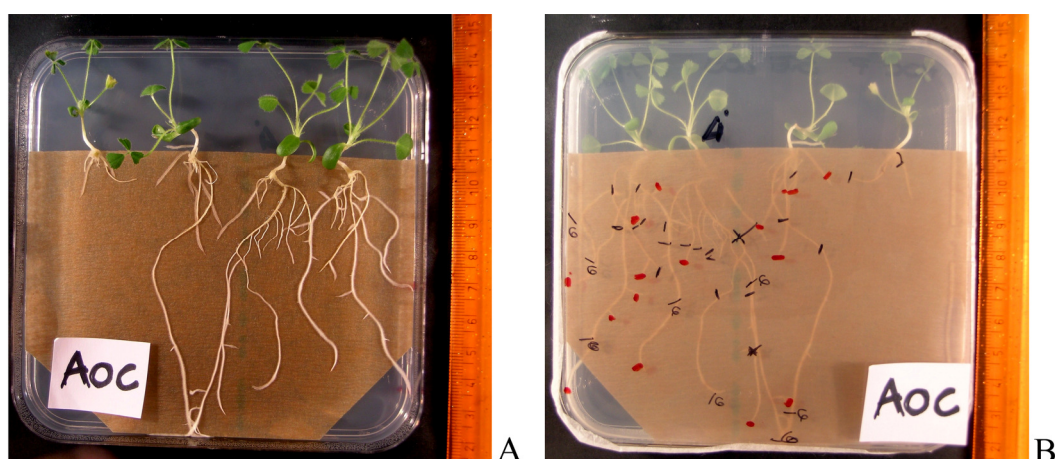


Figura 3.3 Esempio di piante *M. truncatula* cresciute in vitro (**A**) sulle quali è stata monitorata giornalmente la crescita delle radici primarie, laterali e laterali-laterali (**B**) e sulle quali è stata effettuata la misura della lunghezza radicale mediante il programma “ImageJ”.

3.1.3 ESPERIMENTI CONDOTTI SU PIANTE DI *M. truncatula* WT

3.1.3.1 Semina e trattamento per lo stress salino

Semi di *M. truncatula* (Jemalong A17) sono stati scarificati in acido solforico concentrato e sterilizzati utilizzando il protocollo di de Lorenzo e collaboratori (2007) e posti su *Fahraeus medium* per 2 giorni a 4 °C ed una notte a 24 °C al buio per uniformare la germinazione.

Quindi sono stati posti in vasi contenenti terreno sintetico sabbia: perlite (1:3, peso/peso), in serra (ad una temperatura di 25±2 °C, 50±5% di umidità relativa ed un fotoperiodo di 16 ore) ed innaffiati regolarmente per 8 settimane.

Le piante sono state infine innaffiate con una soluzione NaCl 100 mM e dopo 0, 1, 2, 24 e 48 ore sono state collezionate 5 piante per ciascun tempo di stress.

Ogni pianta è stata quindi suddivisa nelle sue componenti (radici, fusto e foglie) ed il materiale vegetale è stato congelato a -80 °C.

3.1.3.2 Determinazione tramite analisi in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) di JA, JA-Ile, OPDA ed acido abscissico e acido salicilico

I campioni vegetali congelati (0,05 g) sono stati polverizzati in azoto liquido con mortaio e pestello e omogeneizzati in 2,5 ml di acqua ultrapura. Il campione, posto in un tubo da 15 ml è stato centrifugato a 5000 x g per 40 minuti, il pH del sovrantante è stato portato a pH 2,8 con acido acetico e quindi processato con due volumi di dietil-etere per due volte. Il residuo solido ottenuto per evaporazione dalla fase organica, dopo trattamento con rotavapor (Rotavapor R-205,

Buchi, Svizzera) a temperatura ambiente, è stato disciolto in una soluzione di acqua/metanolo (90:10, Flors e coll., 2008) e purificato su un filtro di cellulosa-acetato (0,22 µm). 20 µl di campione sono stati quindi analizzati in HPLC (Waters Alliance 2690 HPLC system, Milford, USA), iniettandoli direttamente su colonna a fase inversa nucleosil-ODS (100 x 2 mm, Scharlab, Germania) interfacciando il sistema cromatografico con uno spettrometro di massa.

Prima dell'omogenizzazione, una mix di tutti i composti da analizzare è stata aggiunta al campione nel volume di 2,5 ml. 100 ng di ciascuna sostanza sono stati mescolati in acqua ultrapura ed utilizzati quindi come standard interno.

3.2 ESPERIMENTI SULLO STRESS IDRICO (SICCITA')

3.2.1 Semina e trattamento per lo stress idrico

Semi di *Cicer arietinum* delle cultivar ICC 4958 (tollerante alla siccità) e ICC 1882 (sensibile alla siccità), selezionati e forniti dall'ICRISAT (*International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, Patancheru, India) sono stati sottoposti a vernalizzazione prima di procedere alla semina. Il trattamento consiste nel porre i semi in acqua, al buio ed a 4 °C per 3 giorni, per sincronizzare la germinazione e ottenere piantine con uniforme accrescimento.

I semi sono stati posti in vasi contenente terra, le piante innaffiate ogni giorno con 100 ml di acqua per uniformare il grado di idratazione del terreno. La crescita è stata condotta in serra per 3 settimane ad una temperatura di 25±2 °C, 50±5% di umidità relativa ed un fotoperiodo di 16 ore.

Entrambe le linee, alla terza settimana sono state sottoposte a stress idrico: la somministrazione di acqua è stata interrotta e tre piante per ciascun tempo di stress (0, 2, 24, 48 e 72 ore) sono state recuperate. Le radici sono state private dei residui terrosi, congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C.

3.2.2 Determinazione del *Relative Water Content* (RWC)

I tessuti verdi di piante di cece sono state collezionate ed immediatamente pesati per determinarne il peso fresco (PF). Sono stati quindi reidratati immergendoli in acqua per 24 ore a 4 °C in tubi da 50 ml e pesati nuovamente per ottenere il peso turgido (PT). Infine, i campioni sono stati posti in stufa per 48 ore a 80 °C ed è stato stimato il peso secco (PS).

La seguente equazione (Jain & Chattopadhyay, 2010) è stata utilizzata per determinare il *Relative Water Content* (RWC):

$$RCW (\%) = (PF - PS / PT - PS) \times 100.$$

3.2.3 Estrazione e dosaggio delle clorofille

Per ciascuna pianta, la parte aerea è stata privata dell'apparato radicale e 0,5 g di epigeo, sono stati congelati in azoto liquido, macinati con mortaio e pestello. La polvere disciolta in 50 ml di acetone 80% freddo, è stata trasferita in tubi da 50 ml e messa ad agitare su agitatore rotante, per 30 minuti ed ad una velocità di 30 rpm. Il campione è stato centrifugato 5 minuti a 300 x g a temperatura ambiente e 1 ml di sovranatante è stato utilizzato per leggere l'assorbanza del campione alle lunghezze d'onda di 750 nm ($A_{750} = 0$ per estratti puliti), 645nm (picco di assorbimento per le clorofille *b*), 662 nm (picco di assorbimento per le clorofille *a*) e 520 nm (per estratti ottenuti da tessuti verdi, A_{520} dovrebbe essere inferiore del 10% di A_{662}). Quindi, per ciascun campione, sono state determinate la quantità di clorofilla *a*, *b* ed il totale, applicando le seguenti equazioni (Lichtenthaler & Buschmann, 2001):

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 12,25 A_{662} - 2,79 A_{645}$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 34,09 A_{645} - 5,10 A_{662}$$

$$c_{(a+b)} = c_a + c_b.$$

3.2.4 Estrazione di RNA e sintesi del cDNA

RNA totale è stato estratto dal tessuto radicale, collezionato e congelato, di piante di cece controllo e sottoposte a stress idrico ed utilizzato per la sintesi del cDNA come sopra descritto.

3.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Primer (*forward* e *reverse*) specifici per i geni *lox1*, *lox2*, *aos*, *aoc*, *opr*, α -*dox*, *hpl1* e *hpl2* e le relative sonde fluorescenti (*probe*) sono state forniti dalla Genxpro (Francoforte, Germania). In particolare, le sonde sono state marcate alle estremità 5' con il fluoroforo *reporter* FAM (6-carbossi-fluoresceina) che fluoresce nel verde e all'estremità 3' il fluoroforo *quencher* TAMRA (6-carbossi-tetrametil-rodamina) che fluoresce nel rosso. L'analisi è stata condotta replicando il campione per tre volte ed utilizzando la β -tubulina come gene costitutivo; "TaqMan PCR Master Mix" (Applied Biosystems, USA) ha permesso l'amplificazione delle sequenze geniche di interesse e l'utilizzo della strumentazione "RT-PCR Applied Biosystems 7500" e del *software* "7500 System SDS".

Per ogni campione è stata quindi preparata la seguente mix di reazione, suddivisa poi in tre pozzetti di una piastra "MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate" (Applied Biosystems, USA):

cDNA	1,5 µl
“TaqMan PCR Master Mix”	12,5 µl (x 4 repliche)
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,25 µl (x 4 repliche)
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,25 µl (x 4 repliche)
<i>Probe</i>	2,5 µl (x 4 repliche)
Acqua	9 µl (x 4 repliche).

3.2.6 Determinazione tramite analisi in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) di JA, JA-Ile, OPDA ed Acido Abscissico

0,05 g di ciascun campione radicale è stato processato e sottoposto ad analisi come precedentemente riportato.

3.2.7 Determinazione di idroperossidi in HPLC

In un tubo da 50 ml, contenente 0,5 g di radici macinate come sopra descritto, sono stati aggiunti 5 ml di una soluzione NaOH 0,2 N e NaBH₄ 5%. Il tutto è stato mescolato su vortex per circa 1 minuto e sono stati aggiunto 10 ml di una soluzione cloroformio:metanolo (2:1, v/v) e 200 µl di acido acetico per HPLC. Il tutto è stato mescolato su vortex per circa 1 minuto e centrifugato per 5 minuti a 4400 x g, in modo da separare le due fasi. La fase sottostante è stata trasferita in un pallone di vetro ed alla fase superiore sono stati aggiunti nuovamente 10 ml della soluzione cloroformio:metanolo (2:1, v/v), ripetendo l'estrazione nelle medesime condizioni sopra indicate. La fase sottostante quindi è stata recuperata e aggiunta alla precedente nel pallone di vetro, in cui è stato possibile portare a secco la fase organica tramite l'utilizzo di un rotavapor (Rotavapor R-205, Buchi, Svizzera).

Al residuo secco così ottenuto sono stati quindi aggiunti 2,5 ml di etanolo e 2,5 ml di NaOH 3,5 N; i campioni sono stati riscaldati a 100 °C per 15 minuti in un bagnetto ed il pH della soluzione è stato portato a pH 4,5 con acido acetico per HPLC. La soluzione è stata quindi trasferita in un nuovo tubo da 50 ml in cui è stata ripetuta l'estrazione con 2 volumi della soluzione cloroformio:metanolo (2:1, v/v) per due volte, nelle medesime condizioni riportate in precedenza. Le fasi inferiori raccolte in un pallone di vetro sono state infine portate a secco con l'utilizzo del rotavapor (Rotavapor R-205, Buchi, Svizzera) ed il residuo ottenuto disciolto in 500 µl di metanolo ed analizzato in HPLC in fase inversa su colonna *C₁₈ Ultrasphere* (0,46 x 25 cm, Beckman, USA) con fase mobile metanolo:acqua:acido acetico (85:15:0,1; v/v). L'analisi degli idroperossidi è stata condotta misurando l'assorbanza a 234 nm (*A₂₃₄*). L'analisi degli isomeri degli idroperossidi è stata effettuata su colonna *Silica Ultrasphere* (0,46 x 25 cm,

Beckman, USA) equilibrata con una soluzione di n-esano:2-propanolo:acido acetico (100:2:0,1; v/v), mentre la composizione enantiomerica è stata analizzata in HPLC su fase chirale su una colonna *Chiralcel OB* (0,46 x 25 cm, diametro particelle 5 µm, Daicel. Chem. Industries, Giappone) e con fase mobile n-esano:2-propanolo:acido acetico (100:5:0,1; v/v) e velocità di flusso pari a 1 ml/minuto (Mita e col., 2007). Tutte le analisi sono state condotte su uno strumento “Agilent 1100 series HPLC system” (Waldbronn, Germania).

Per permettere un'analisi quali-quantitativa degli idroperossidi presenti nei campioni, una curva di calibrazione è stata costruita su 5 misure di quantità note e crescenti di standard commerciali: di 9- e 13-idroperossidi dell'acido linoleico e linolenico (Larodan, Malmö, Sweden).

3.2.8 Determinazione di aldeidi in HPLC

0,05 g di materiale vegetale congelato sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido e la polvere è stata disciolta in 5 ml di una soluzione di metanolo (80%) in cui è stato diluito lo standard interno (5 nmoli di eptanale, “Heptanal ≥ 92% FCC”, SAFC, Germania). La soluzione, posta in un tubo è stata incubata per 1 ora in un bagnetto a 60 °C e quindi lasciata raffreddare. Sono stati aggiunti 2,5 ml di soluzione 2,4-dinitrofenilidrazina (0,1%) (2,4-Dinitrophenilidrazine, Sigma-Aldrich, USA), il tutto è stato mescolato su vortex per 1 minuto e posto a 25 °C per 1 ora. Gli idrazoni che si liberano durante la reazione sono poi stati estratti con 2,5 ml di n-esano, la soluzione è stata mescolata su vortex e poi centrifugata per 2 minuti a 2700 x g per permettere la separazione delle due fasi. La fase organica superiore è stata infine trasferita in un pallone di vetro e portata a secco tramite rotavapor (Rotavapor R-205, Buchi, Svizzera). Il residuo secco è stato disciolto in 50 µl di acetonitrile ed analizzato in un sistema “Agilent 1100 series HPLC system” (Waldbronn, Germania) in fase inversa, con fase mobile CH₃CN/THF/H₂O (74/1/25, v/v), velocità di flusso pari a 1 ml/minuto e A₃₅₀.

Per permettere un'analisi quali-quantitativa delle aldeidi presenti nei campioni, quantità note e crescenti di standard sono stati preparati ed analizzati in HPLC nelle medesime condizioni utilizzate per l'esperimento, per costruire una curva di calibrazione.

Standard utilizzati: “Hexanal 98%” (Sigma-Aldrich, USA); “trans-2, cis-6-nonadienal 92%FCC” (Sigma-Aldrich, USA) e “trans-2-nonenal 93%” (Sigma-Aldrich, USA).

Soluzione 2-4 dinitri fenilidrazina 0,1%

2-4 dinitri fenilidrazina	0,1%
Acido acetico	2%
Etanolo assoluto (per HPLC)	a volume.

3.3 ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

3.3.1 LOCALIZZAZIONE DEGLI ENZIMI IN FOGLIE DI *M. truncatula*

3.3.1.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Semi di *M. truncatula* (Jemalong A17) sono stati scarificati, sterilizzati e seminati su piastre *Fahraeus medium* (agar 1,5%) come sopra descritto.

Le piastre sono quindi state poste in camera di crescita ad una temperatura di 25 °C, con un fotoperiodo luce/buio di 18/6 ore. Dopo 15 giorni le piantine sono state collezionate, la parte aerea separata dalla radice e congelata in azoto liquido.

3.3.1.2 Isolamento e frazionamento biochimico dei cloroplasti

La componente aerea congelata è stata finemente tritata in un *buffer* di omogeneizzazione e centrifugata a 1000 x g per 10 minuti, in modo da ottenere un *pellet* (componente plastidiale) ed un sovranatante. Dal *pellet* i cloroplasti sono stati isolati su un gradiente di “Percoll” (Amersham-Pharmacia Biotech, Svezia) come descritto da Leon e collaboratori (2002), come di seguito riportato. A seguito della lisi dei cloroplasti con una soluzione isotonica (*Lysis buffer*), le membrane e la componente solubile sono state separate su un gradiente di saccarosio come indicato da Froehlich e coll. (2001), come di seguito riportato.

Buffer di omogeneizzazione

HEPES/KOH (pH 7,0)	40 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
EDTA	2 mM
Saccarosio	0.33 M
Inibitore di proteasi (Roche, Mannheim, Germany)	100 X

Lysis buffer

HEPES/KOH (pH 7,8)	10 mM
EDTA	2 mM

3.3.1.3 Isolamento e frazionamento biochimico delle membrane tilacoidali

Per ottenere le membrane purificate dei grana è stato utilizzato il protocollo descritto da Berthold e coll. (1981), denominato BBY, che permette di arricchire la frazione tilacoidale con le membrane dei grana mediante digestione con Triton X-100 (0,1%).

Per ottenere le frazioni della lamella, stromatica e dei grana è stato utilizzato in protocollo che utilizza digitonina e centrifugazioni differenziali descritto da Timperio e collaboratori (2004).

3.3.2 LOCALIZZAZIONE CELLULARE DI *MtHPL*

3.3.2.1 Costrutti ricombinanti utilizzati

Costrutti necessari a caratterizzare la localizzazione della proteina *MtHPL* (HPL3, *Gene Bank*: DQ011231) sono stati ottenuti a partire dal costrutto genico prodotto nel laboratorio John Innes Centre (Norwich Research Park, GB) pG₂HPL-YFP, in cui la sequenza nucleotidica codificante per la 13-HPL di *M. truncatula* (HPL) è fusa a monte della sequenza codificante per la proteina fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e clonata nel vettore di espressione pGreenII (pG₂) (De Domenico e coll., 2007).

Utilizzando le tecniche di biologia molecolare precedentemente descritte (PCR, analisi e purificazione dei frammenti nucleotidici) e primer opportunamente disegnati in modo da inserire alle estremità 5' e 3' terminale i siti di restrizione per gli enzimi *Bam*HI e *Nhe*I rispettivamente, sono stati ottenuti due frammenti nucleotidici denominati TP₅₉ e -HPL. Il primo codifica per il peptide di transito (TP₅₉) presente nella regione N-terminale dell'idroperossido liasi, il secondo per la restante parte della proteina (-HPL) (Fig. 3.4).

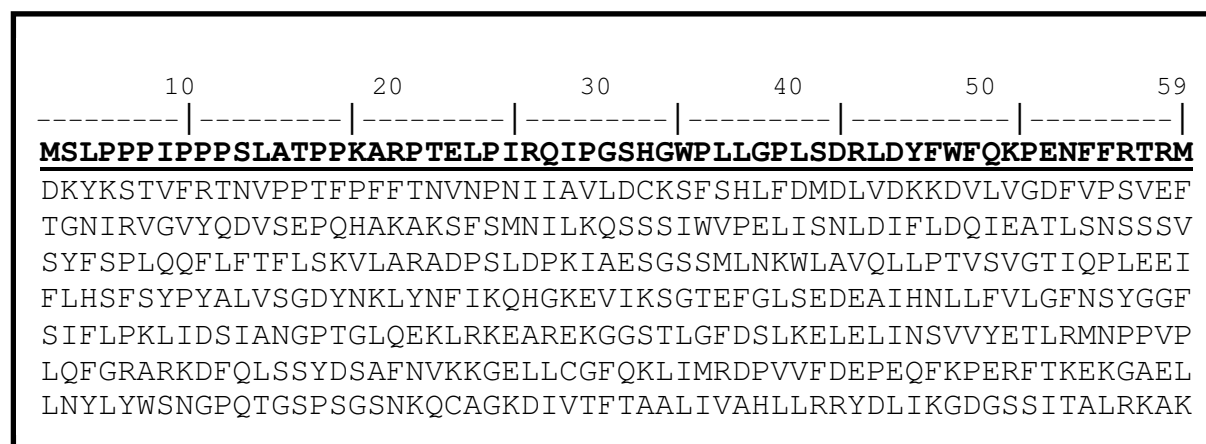


Figura 3.4 Sequenza aminoacidica di *MtHPL* su cui è stata predetta la presenza di un peptide di transito per il cloroplasto (in evidenza) utilizzando il programma informatico ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>).

I primer

- TP59 For: 5'-TAG G | GA TCC ATG TCA CTC CCA CCA CCG - 3'
- TP59 Rev: 5'-GCA CGT G | CT AGC TCG TGT TCT GAA GAA G- 3'
- -HPL For: 5'-TGC TGC G | GA TCC CGA ATG GAC AAG TAC - 3'
- -HPL Rev: 5'-TGC TGC G | GA TCC CGA ATG GAC AAG TAC - 3'

ed i siti di restrizione così inseriti, sono stati utilizzati per il clonaggio dei due frammenti in un vettore di espressione già presente nel laboratorio CNR-ISPA (OLE-GFP/pUC, Mita e coll., 2005) ed ottenere così i plasmidi ricombinanti TP₅₉-GFP/ pUC e -HPL-GFP/pUC, in cui i cDNA di interesse sono fusi a monte della sequenza codificante per la proteina fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) inserita nel vettore di espressione pUC.

Per gli esperimenti di co-localizzazione è stato utilizzato il costrutto RFP-KDEL/pUC già presente nel laboratorio CNR-ISPA (De Domenico e coll., 2007).

3.3.2.2 Preparazione di protoplasti da foglie di *Nicotina tabacum*

I protoplasti del mesofillo fogliare di *Nicotiana tabacum* sono stati ottenuti da piantine cresciute in condizioni sterili e non. Le foglie più espanse delle piante sterili sono state trasferite direttamente in una piastra e ad essa sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione di digestione. Le foglie delle piantine cresciute in terra, prima di essere poste in piastra con la soluzione, sono state sterilizzate immergendole per alcuni secondi in una soluzione diluita di candeggina (1:5) e poi due volte in acqua sterile.

Dalle foglie è stata rimossa la nervatura centrale, sono stati praticati numerosi tagli e si è portato ad un volume finale di 10 ml di soluzione di digestione. Le piastre, chiuse con parafilm, sono state messe ad incubare O.N. (da un minimo di 14 ad un massimo di 18 ore) a 26 °C e al buio.

Il giorno successivo, per permettere ai protoplasti di distaccarsi completamente dalla struttura fogliare, le piastre sono state messe in agitazione (50 giri/minuto) per 10-30 minuti. La sospensione è stata prelevata con una pipetta sterile con la punta tagliata (per evitare il danneggiamento delle cellule), filtrata delicatamente su di un filtro di acciaio con maglie di 150 µm (sterilizzato su fiamma) e quindi suddivisa in aliquote (di circa 5 ml) in tubi sterili da 15 ml (il volume può essere aggiustato con soluzione K3). Ad ogni aliquota, lentamente, è stato aggiunto sulla superficie 1 ml di soluzione W5, senza mescolare, in modo da formare un gradiente. Si è quindi centrifugato per 10 minuti, ad una velocità di 70 x g, con una minima accelerazione e senza freni: le cellule vive si stratificano all'interfaccia tra le due fasi, quelle rotte sedimentano sul fondo del tubo. I protoplasti integri sono stati raccolti con una pipetta sterile con la punta tagliata, cercando di non prelevare la fase inferiore (soluzione di digestione), ma prelevando tutta la fase superiore (soluzione W5). Così raccolti (più o meno 3 ml per tubo) sono stati diluiti con circa 10 ml di W5 e, dopo una delicata agitazione, sono stati lavati centrifugando per 5 minuti a 70 x g, con le medesime condizioni di accelerazione e decelerazione della prima centrifugazione. Il liquido sovranatante è stato eliminato lasciando il *pellet* sul fondo del tubo; il lavaggio è stato ripetuto 2 volte ed infine i protoplasti sono stati posti

in un volume totale di 5-6 ml di soluzione W5, per 2 ore a 4 °C, in tubi posti orizzontalmente per favorire l'aerazione della soluzione.

3.3.2.3 Trasformazione di protoplasti per l'espressione transiente

Dopo le 2 ore a 4 °C, le cellule sono state pellettate (5 minuti a 70 x g, accelerazione minima e decelerazione nulla), risospese in un'idonea quantità di soluzione MMM (300 µl per ogni trasformazione), riunite quindi in un unico tubo.

La trasformazione dei protoplasti è stata effettuata seguendo i passaggi sotto riportati:

- sono stati preparati nuovi tubi e in essi sono stati messi 300 µl di sospensione cellulare usando una pipetta dalla punta tagliata;
- ad ogni aliquota è stato aggiunto il DNA plasmidico (10 µg) e si è agitato delicatamente;
- sono stati aggiunti poi 300 µl di soluzione PEG 40% agitando delicatamente per mescolare le due fasi create;
- dopo 2-3 minuti sono stati aggiunti 2 ml di soluzione K3;
- la soluzione ottenuta è stata incubata al buio, ad una temperatura di 27-28 °C.
- dopo due ore sono stati aggiunti 5 ml di soluzione W5, per lavare via la soluzione PEG, centrifugando a 70 x g per 5 minuti;
- i protoplasti sono stati quindi risospesi in un volume di 2 ml di soluzione K3 e messi a incubare a 27 °C, al buio nelle 24 ore successive.

Il giorno dopo si è proceduto all'osservazione al microscopio confocale.

Soluzione di digestione: in 100 ml di soluzione K3

“Cellulase Onozuka R10” 1,2 g

“Macerozima R10” 0,4 g

Saccarosio 0,3 g

Sterilizzare per filtrazione.

K3-MACRO (1 l)

KNO₃ 25,3 g

NH₄NO₂ 2,5 g

NaH₂PO₄ * 2H₂O 1,5 g

CaCl₂ * 2H₂O 9,0 g

(NH₄)₂SO₄ 1,34 g

MgSO₄ * 7H₂O 2,5 g

Sterilizzare in autoclave.

B5-micro 100 ml

MgSO ₄ * H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,2 mg
H ₃ BO ₃	0,3 g
KI	0,075 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	2,5 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2,5 mg

Sterilizzare in autoclave o per filtrazione.

<u>Na₂EDTA</u> (200 X)	14,92 g/l
-----------------------------------	-----------

Sterilizzare per filtrazione.

<u>FeCl₃ * 6H₂O</u> (200 X)	5,4 g/l
---	---------

Sterilizzare in autoclave.

K3 (0,3 M di saccarosio) 1 l

Na ₂ EDTA (200 X)	5ml
K3-macro	100 ml
FeCl ₃ *6H ₂ O (200 X)	5 ml
B5-micro	1 ml
K3-vit	10 ml
Saccarosio	102,7 g
Xilosio	0,25 g

Portare a pH 5,8 con KOH e sterilizzare in autoclave. Lasciare raffreddare ed aggiungere gli ormoni: 2,4-D 0,5 ml; NAA 0,5 ml e BAP 1 ml.

2,4-D: 20 mg in 1 ml di etanolo, portare a 100 ml con H₂O. Si sterilizza per filtrazione.

NAA: 20 mg in 1 ml di etanolo assoluto, portare a 100 ml con H₂O. Si sterilizza per filtrazione.

BAP: 20 mg in 1 ml di KOH 1 M, portare a 100 ml con H₂O. Si sterilizza per filtrazione.

W5 osmotico 1 l

NaCl	9 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	18,3 g
KCl	0,37 g
Glucosio	1 g

Sterilizzare in autoclave.

MMM 100 ml

Mannitolo	9,11 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,3 g
MES	0,1 g

Sterilizzare in autoclave.

Soluzione PEG

Mannitolo	7,28 g
Ca(NO ₃) ₂	2,36 g

Aggiungere circa 40 ml di H₂O distillata e portare a pH 8 con KOH. Aggiungere “PEG 4000” al 40% e portare a 100 ml con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave.

3.3.2.4 Microscopia confocale

Tutte le osservazioni condotte sulle piante e sui protoplasti di *N. tabacum* sono state effettuate con un microscopio confocale a fluorescenza “LSM 510 Laser Scanning Microscope PASCAL” della ditta ZEISS (Jena, Germania). I campioni sono stati eccitati con un'unica lunghezza d'onda di 488 nm. La fluorescenza emessa da GFP e YFP è stata catturata utilizzando il set di filtri FITC (505-530 nm), quella di RFP con un filtro 560-615 nm, mentre la fluorescenza della clorofilla è stata ottenuta con filtri TRITC (>650 nm).

3.3.2.5 Frazionamento sub-cellulare

A seguito delle osservazioni in microscopia confocale, i protoplasti trasformati sono stati raccolti sul fondo del tubo, mediante centrifugazione (70 x g per 5 minuti, accelerazione minima e decelerazione nulla) in presenza di 5 ml di soluzione W5.

Il materiale vegetale è stato congelato e scongelato in azoto liquido per permettere la rottura delle cellule, finemente triturato in un *buffer* di omogeneizzazione e centrifugato a 1000 x g per 10 minuti, in modo da ottenere un *pellet* (componente plastidiale) ed un sovranatante.

Dal *pellet* i cloroplasti sono stati isolati su un gradiente di “Percoll” (Amersham-Pharmacia Biotech, Svezia) come descritto da Leon e collaboratori (2002): il *pellet* è stato recuperato con 2 ml di *loading buffer* e stratificato su un gradiente discontinuo composto da 3 ml di Percoll *solution* (75%) e 8 ml di Percoll *solution* (35%).

I plastidi integri, stratificati all'interfaccia dei due gradienti, sono stati recuperati e lisati nel seguente modo:

- aggiungere 11 ml di *lysis buffer*;
- porre 2 minuti in ghiaccio;

- aggiungere 4 ml di saccarosio 2 M e centrifugare 5 minuti a 16500 x g in un rotore a bracci oscillanti.

A seguito di tale centrifugazione si sono ottenute così una frazione solubile (nel sovranatante) e una componente di membrana (nel *pellet*) (Froehlich e coll., 2001).

Loading buffer

HEPES/KOH (pH 7,0)	50 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
EDTA	2 mM
Saccarosio	0,33 M
Inibitore di proteasi (Roche, Mannheim, Germany)	100 X

Percol solution

Le soluzioni al 75% e al 35% sono state preparate utilizzando il *Loading buffer* come solvente.

Lysis buffer

HEPES/KOH (pH 7,8)	10 mM
EDTA	2 mM

Il sovranatante, costituito dalle membrane e dalla componente solubile, è stato in un primo momento riposto in un nuovo tubo da 12 ml e centrifugato a 3000 x g per 15 minuti per rimuovere eventuali tracce plastidiali. Il nuovo sovranatante, così “pulito”, è stato portato ad un volume di 12 ml con un *separating buffer* ed ultracentrifugato in tubi sterili da 12 ml alla velocità di 100000 x g per 30 minuti. E’ stato così possibile ottenere una frazione microsomiale (*pellet*) ed una solubile (sovrinatante).

Separating buffer

HEPES/KOH (pH 7,0)	0 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
EDTA	2 mM
Saccarosio	100 mM
Inibitore di proteasi (Roche, Mannheim, Germany)	100 X

3.3.2.6 Separazione delle proteine su gel di poliacrilammide

La separazione dei campioni proteici è stata effettuata su gel di poliacrilammide al 10%, dello spessore di 1,5 mm, in presenza di SDS (SDS-PAGE), nell'apparato per elettroforesi "Bio-Rad tipo Miniprotein II" (Hercules, California). Prima di caricare i campioni su gel è stata effettuata una breve pre-corsa (15 minuti circa) a corrente costante di 15 mA. La corsa elettroforetica è stata effettuata ad intensità di corrente costante e ultimata l'elettroforesi, il gel è stato utilizzato per l'elettrotrasferimento delle proteine su membrana.

Le soluzioni utilizzate per preparare i gel sono le seguenti:

Soluzione madre di Acrilammide/Bis 40%:

Acrilammide/Bis	40% (w/v)
N-N'- metilen-bis-acrilammide	0,8% (w/v)

Running gel

Acrilammide/Bis 40	1,9 ml
SDS 20%	50 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
APS (Ammonio Persolfato) 10%	50 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O distillata	5,5 ml

Stacking gel

Acrilammide/Bis 40%	1 ml
SDS 20%	50 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	1,25 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O distillata	7,64 ml

Tampone per corsa elettroforetica (pH tra 8,3 e 8,7) tampone 5 X:

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,5%

Il tampone è stato utilizzato alla concentrazione 1X.

3.3.2.7 Western blot

Il “Western blot” è una tecnica analitica che consiste nel trasferimento di proteine, separate mediante elettroforesi su gel, su una membrana (in genere di nylon o nitrocellulosa) e nell’ibridazione della stessa con un anticorpo specifico per la proteina di interesse.

Dopo la separazione delle proteine su gel di poliacrilammide mediante elettroforesi, queste sono state elettrotrasferite, utilizzando il “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell” (BioRad, USA) su una membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è stato condotto per circa 1 ora a 100 V (voltaggio costante). La membrana è stata incubata in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di TBS 1X, Tween-20 (0,5%) e latte in polvere (3%), in modo da bloccare i siti di interazione idrofobia aspecifici, e quindi per 1 ora in agitazione con l’anticorpo primario diluito in una soluzione di TBS 1X, Tween-20 (0,5%) e latte in polvere (3%). Successivamente la membrana è stata sottoposta a 2 lavaggi, di 10 minuti ognuno, con una soluzione di TBS 1X/Tween-20 (0,5%) e quindi è stata incubata per 1 ora con l’anti-anticorpo anti-immunoglobuline (Ig-G) di coniglio, diluito in una soluzione di TBS 1X, Tween-20 (0,5%) e latte in polvere (3%). Infine la membrana è stata sottoposta a 2 lavaggi di 15 minuti ciascuno con una soluzione di TBS 1X e Tween-20 (0,5%).

Per la rilevazione dei polipeptidi è stato utilizzato il sistema di rivelazione chemiluminescente “Western lightning Chemiluminescence” (Perkin Elmer Life Sciences, USA). 3 ml di *Enhanced Luminol Reagent* sono stati mescolati con 3 ml di *Oxidizing Reagent* in camera oscura e subito versati sulla membrana posta su una lastra di vetro all’interno di una cassetta per autoradiografia. Dopo 2 minuti di incubazione la membrana è stata asciugata tamponando con carta, ricoperta con uno strato di pellicola trasparente e messa a contatto con una lastra autoradiografica. Le lastre sono state esposte per tempi variabili e in seguito sviluppate.

Tampone di elettrotrasferimento (pH tra 8,3 e 8,7)

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
Metanolo	20%

TBS 10X

Tris	0,5 M pH 7,5
NaCl	1,5 M.

RISULTATI

4. RISULTATI

4.1 ESPERIMENTI SULLO STRESS SALINO

4.1.1 Identificazione dei geni chiave del metabolismo delle ossilipine implicati nella risposta a stress salino

Estrapolando i dati dall'analisi microarray effettuata da Gruber e coll. (2009) è stato possibile osservare che quattro geni chiave del metabolismo delle ossilipine vengono sovra-espressi nel genotipo Jemalong A17 di *Medicago truncatula* quando la pianta è sottoposta a stress salino (100 mM NaCl) per 1 ora.

I dati riportati in tabella 4.1 indicano che i geni codificanti per gli enzimi lipossigenasi (*lox*), 9/13-idroperossidoliasi (*hpl*), allene ossido sintasi (*aos*) e allene ossido ciclasi (*aoc*) presentano livelli di sovra-espressione pari a 5,84 - 6,2 - 2,87 e 8,54 rispettivamente.

MTGI8-TIGR	Annotation	Affymetrix array	Mt16kOLI array	FC SSI (A17 salt)
TC100141	Auto IPR : Lipoxygenase	Mtr.8427.1.S1_at	MT006989	5,84
TC107037	Auto IPR : Cytochrome P450 (HPL)	Mtr.40321.1.S1_at	MT000471	6,2
TC101097	Auto IPR : E-class P450, group IV (AOS)	Mtr.37633.1.S1_at	MT007726	2,87
TC97780	Auto IPR : Allene oxide cyclase	Mtr.13356.1.S1_at	MT004760	8,54

Tabella 4.1 Risultati ottenuti dall'analisi microarray effettuata da Gruber e collaboratori (2009) relativi ai livelli di espressione (*Fold change*, FC) dei geni coinvolti nel metabolismo delle ossilipine.

L'espressione di questi geni è stata analizzata mediante qRT-PCR su cDNA di piante *M. truncatula* (Jemalong A17) sottoposte a 0, 1 e 3 ore di stress salino (NaCl 100 mM) utilizzando primer specifici per ciascun gene preso in esame, la cui sequenza è descritta in Materiali e Metodi (par. 3.1.2.6). Tale analisi ha permesso di convalidare la sovra-espressione dei geni *lox*, *hpl*, *aos* e *aoc* già a 1 ora dall'inizio dello stress (Fig. 4.1). In particolare, si può notare che i geni *lox* e *aoc* presentano una netta sovra-espressione di circa 7 e 9 volte rispettivamente superiore rispetto al controllo nelle primissime fasi di risposta allo stress.

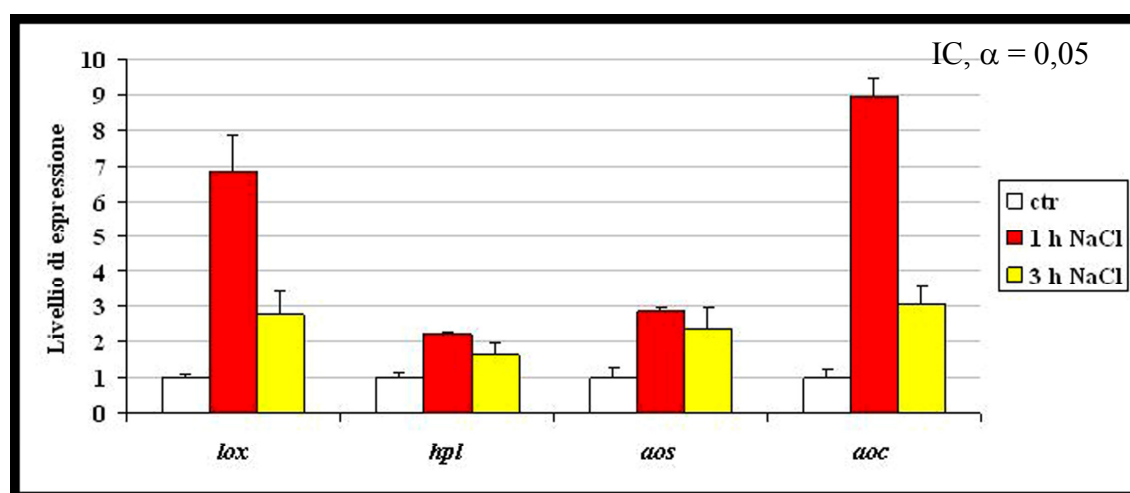


Figura 4.1 Analisi qRT-PCR dei livelli di espressione dei geni *lox*, *hpl*, *aos* e *aoc* in piante di *M. truncatula* (Jemalong A17) controllo (ctr) e sottoposte a 1 e 3 ore di stress salino (NaCl 100 mM). IC, intervallo di confidenza ($\alpha = 0,05$).

4.1.2 Determinazione mediante HPLC del contenuto di ABA e SA, e di OPDA, JA, JA-Ile in radici di piante di *M. truncatula* sottoposte a stress salino

Successivamente è stata condotta un'analisi su piante wt (*wild type*) di *M. truncatula* sottoposte a diversi tempi di stress salino per correlare il contenuto di alcune ossilipine, quali JA e JA-Ile e del loro precursore OPDA, con l'acido abscissico (ABA) e l'acido salicilico (SA) coinvolti nella risposta della pianta a stress.

Piante cresciute in serra per 8 settimane, sono state irrigate con una soluzione NaCl 100 mM (tempo 0) e quindi cinque piante per ciascun tempo di stress (0, 2, 6, 24, 48 ore) sono state separate nelle componenti di radice, fusto e foglie. Il materiale è stato quindi sottoposto ad estrazione chimica e successivamente ad analisi in HPLC.

L'acido abscissico ed il salicilico presentano una diversa distribuzione nella pianta sottoposta a stress; infatti mentre il SA è accumulato soprattutto a livello radicale, l'ABA presenta bassi livelli nella parte ipogea mentre livelli più elevati sono stati evidenziati nei tessuti aerei della pianta (Fig. 4.2A-B).

Per quanto riguarda l'OPDA, il principale precursore del JA, esso presenta bassi livelli di accumulo se comparati con quelli dell'acido jasmonico e jasmonoil-isoleucina; comunque la sua più alta quantità è stata riscontrata nelle foglie, con un leggero incremento sino alle 2 ore di stress (Fig. 4.2C). JA e la sua forma attiva JA-Ile presentano i livelli più alti nella radice, con un picco di accumulo ad 1 ora dall'inizio dello stress. E' da notare che i livelli di JA-Ile nel fusto e

nelle foglie sono molto bassi e che quindi tale ormone non dovrebbe essere coinvolto nella risposta sistemica allo stress salino (Fig. 4.2D-E).

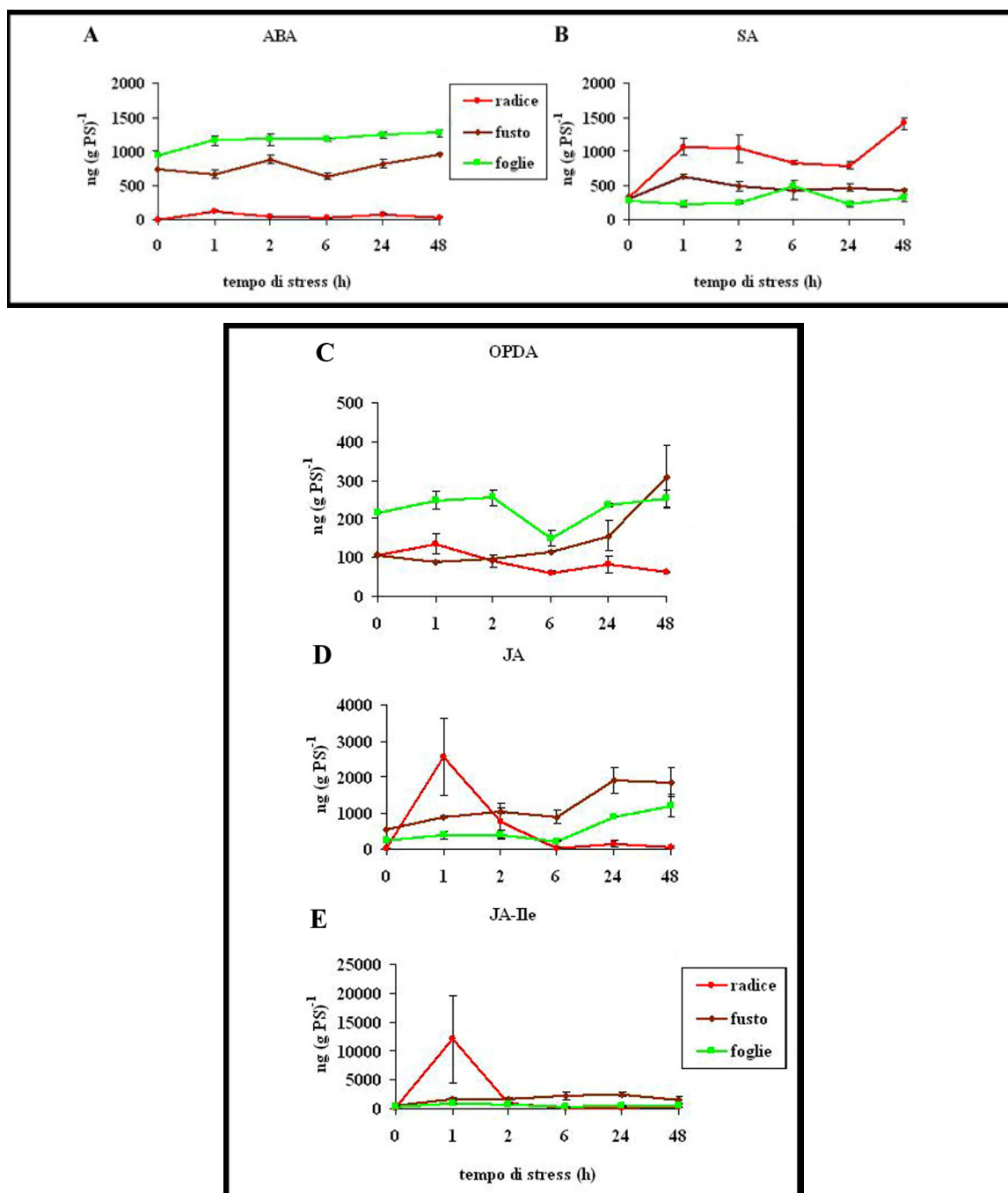


Figura 4.2 Livelli di accumulo a diversi tempi di acido abscissico (A), acido salicilico (B), OPDA (C), acido jasmonico (D) e jasmonoil-isoleucina (E) in radici, fusto e foglie di piante di *M. truncatula* sottoposte a stress salino.

4.1.3 Ricerca ed amplificazione di regioni altamente conservate dei geni di interesse

Una fase preliminare di questa parte di lavoro di tesi ha previsto l'identificazione di EST dei geni lipossigenasi (*lox*), idroperossido liasi (*hpl*), allene ossido sintasi (*aos*) e allene ossido ciclastasi (*aoc*) di *M. truncatula*. Tali sequenze sono state ricavate dalla banca dati informatica DFCI-Plant Gene Index, inserendo le TCs relative a ciascun gene e fornite dal laboratorio dell'Institut des Sciences Végétales (ISV) del CNRS di Gif sur Yvette, Francia (Tabella 4.1).

Le EST sono state quindi utilizzate per effettuare una ricerca in banca dati delle sequenze geniche di interesse, mediante analisi BLAST. La determinazione dell'omologia tra le sequenze nucleotidiche ottenute ed alcuni geni filogeneticamente affini è stata effettuata mediante il programma ClustalW, che ha permesso di identificare in ciascun gene regioni altamente conservate. In prossimità di tali zone, sono stati quindi disegnati primer specifici (come riportato nel capitolo Materiali e Metodi, par. 3.1.1.1) necessari ad amplificare una porzione di circa 200 pb per ciascun gene preso in esame. L'analisi ha permesso anche di dedurre la presenza in *M. truncatula* di più di 15 isoforme diverse del gene *lox*, due isoforme dei geni *hpl* e *aoc*, una sola isoforma del gene *aos* (Figura 4.3).

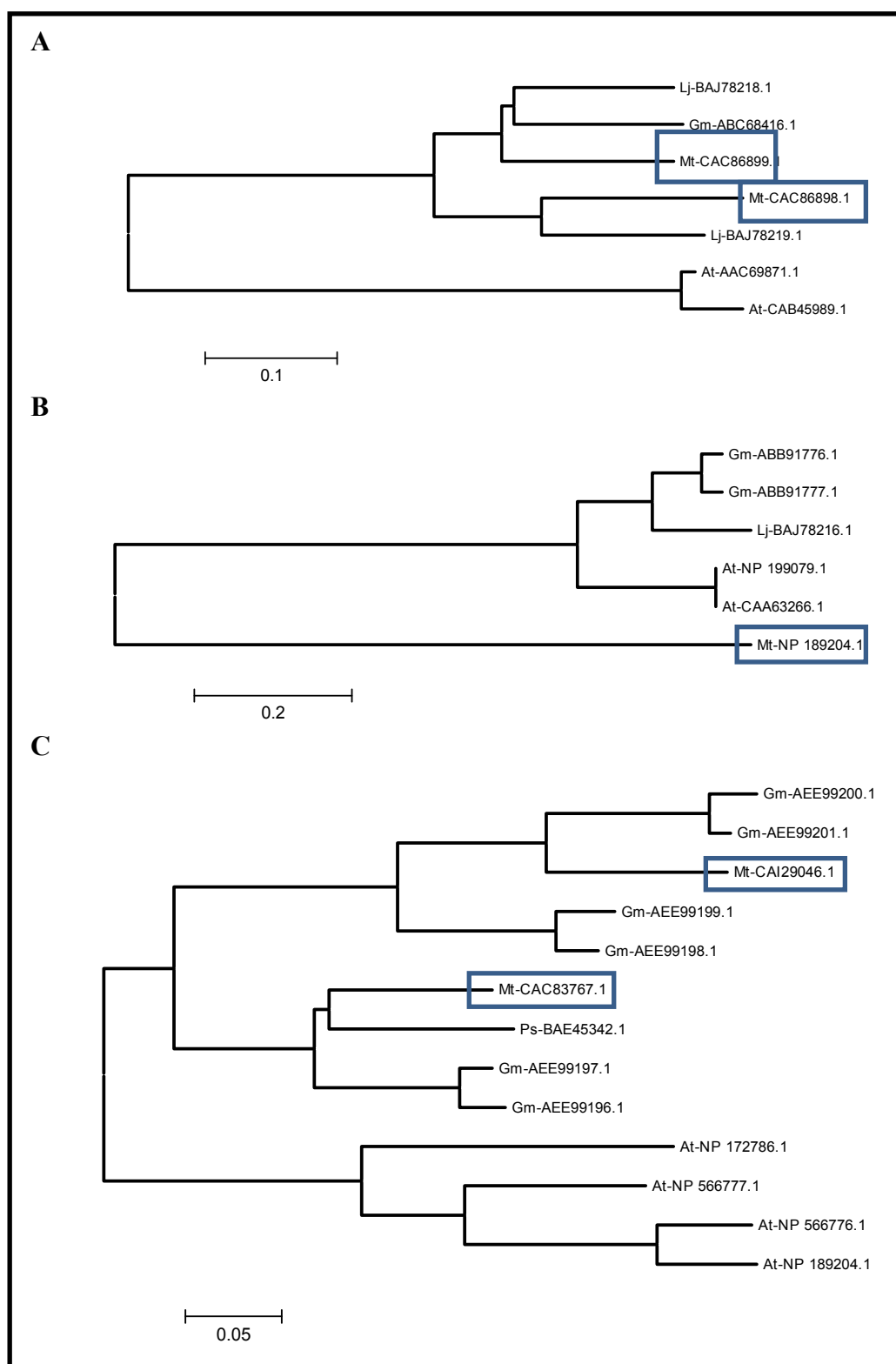


Figura 4.3 Relazione filogenetica delle proteine idroperossidi liasi (A), allene ossido sintasi (B) e allene ossido ciclasti (C) omologhe. Il filogramma è costruito utilizzando sequenze di proteine omologhe.

4.1.4 Produzione di costrutti ricombinanti necessari per il silenziamento genico

I costrutti necessari a silenziare i quattro geni chiave del metabolismo delle ossilipine sono stati ottenuti mediante la Tecnologia *Gateway* (Invitrogen), che prevede il clonaggio di sequenze nucleotidiche in un vettore di partenza (*entry clone*) e successivamente in vettori d'espressione, conservandone l'orientamento e il modulo di lettura.

Le quattro coppie di primer (lox-for e lox-rev; hpl-for e hpl-rev; aos-for e aos-rev; aoc-for e aoc-rev) sono state utilizzate per amplificare frammenti di circa 200 pb (LOX, HPL, AOS e AOC rispettivamente) a partire dal cDNA di piantine di *M. truncatula* (genotipo Jemalong A17) sottoposte a stress salino (NaCl, 100 mM) per 1 ora.

Per ottenere l'*entry clone*, il prodotto di PCR di ciascun gene (LOX, HPL, AOS e AOC) è stato purificato dal gel ed inserito nel vettore pENTR/D/TOPO, mediante una *Topo Cloning Reaction*. I plasmidi ricombinanti (pENTR/D/TOPO-LOX, pENTR/D/TOPO-HPL, pENTR/D/TOPO-AOS e pENTR/D/TOPO-AOC), sono stati replicati in cellule di *E. coli*, cresciute su terreno selettivo. Il DNA plasmidico è quindi stato estratto da colonie positive, selezionate mediante PCR su colonia, ed impiegato in una *LR recombination reaction*, che ha consentito il trasferimento del cDNA di interesse nel vettore RNAi, pFRN (*destination vector*).

I plasmidi LOX/pFRN, HPL/pFRN, AOS/pFRN ed AOC/pFRN sono stati quindi replicati in cellule di *E. coli*, da cui sono stati purificati e sottoposti ad analisi di sequenza e di restrizione per verificare la presenza dell'inserito e il suo corretto orientamento nelle due regioni di inserzione. Il vettore pFRN infatti è costruito in modo da poter inserire la sequenza nucleotidica di interesse in due siti del plasmide con orientamento opposto, "senso" ed "antisenso" (Fig. 4.4), in modo che il gene di interesse sia silenziato per la produzione in cellula di un shRNA (*small hairpin RNA*).

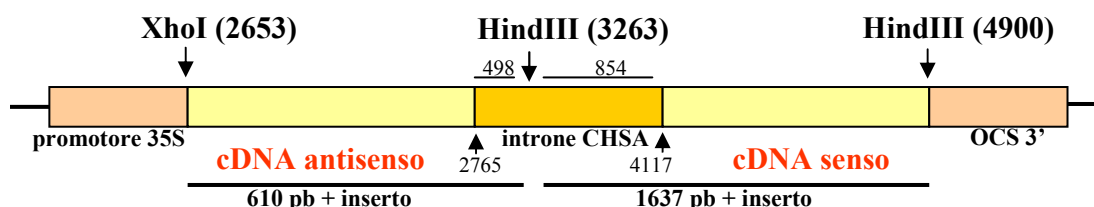


Figura 4.4 Rappresentazione schematica della regione di espressione del vettore RNAi pFRN, in cui sono presenti il promotore forte 35S, i due siti di inserzione per il DNA di interesse, i siti di restrizione per gli enzimi *XhoI* e *HindIII* e l'introne CHSA

Per verificare il corretto orientamento degli inserti, i plasmidi sono stati perciò sottoposti ad analisi di restrizione utilizzando gli enzimi *HindIII* e *XhoI*, che tagliano il plasmide in regioni adiacenti le zone di inserzione del cDNA. Circa il 20% delle colonie testate risultavano positive, con un profilo di restrizione illustrato in figura 4.5.

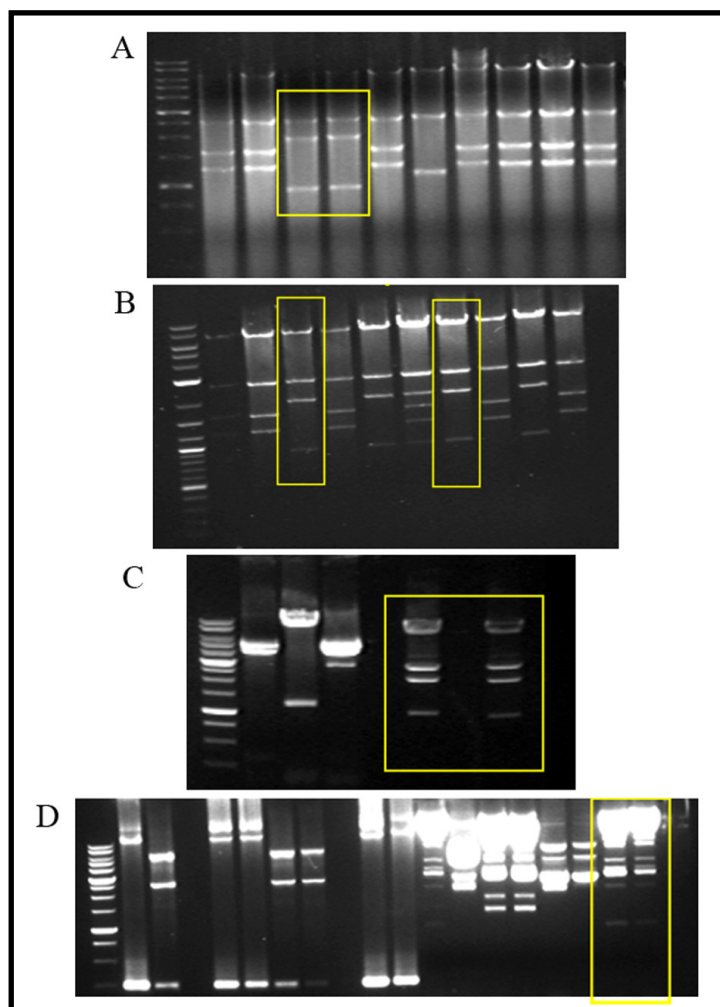


Figura 4.5 Analisi di restrizione effettuata sui plasmidi (A) LOX/pFRN, (B) HPL/pFRN, (C) AOS/pFRN e (D) AOC/pFRN estratti da differenti colonie di *E. coli*. Nei riquadri gialli i plasmidi aventi il corretto *pattern* di restrizione.

4.1.5 Espressione in pianta

I plasmidi LOX/pFRN, HPL/pFRN, AOS/pFRN ed AOC/pFRN sono stati quindi trasferiti in ceppi ARqual di *Agrobacterium rhizogenes*. Anche in questo caso le colonie positive sono state selezionate mediante analisi di restrizione e di sequenza sui plasmidi estratti. I batteri sono stati quindi utilizzati per infettare radici di *M. truncatula* (genotipo Jemalong A17).

Il coinvolgimento di uno dei quattro geni in risposta allo stress salino è stato studiato sulle piante composite così ottenute, monitorando l'effetto del silenziamento genico nella crescita radicale della pianta.

Ciascuna popolazione di piante composite (*lox*-RNAi, *hpl*-RNAi, *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi) è stata suddivisa in due parti uguali: una parte è stata cresciuta in condizioni normali ed è stata utilizzata come controllo (ctr), l'altra è stata sottoposta a stress salino, aggiungendo al terreno di coltura NaCl alla concentrazione di 100 mM.

Le analisi sono state condotte in due diverse condizioni di crescita: su piantine cresciute in vitro è stata monitorata la crescita delle radici primarie, laterali e laterali-laterali; su piante coltivate in serra sono stati valutati la crescita radicale ed il residuo secco di radici e parte aerea.

In tutti gli esperimenti, piante infettate con *A. rhizogenes* recante il plasmide GUS/pFRN (piante *gus*-RNAi) sono state utilizzate come controllo.

4.1.6 Esperimenti in vitro

Piantine composite *lox*-RNAi, *hpl*-RNAi, *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi sono state fatte crescere in condizioni sterili, a 25 °C e con un fotoperiodo luce-buio di 18/6 ore.

Durante gli otto giorni successivi al trasferimento delle piante su terreno addizionato con NaCl 100 mM (NaCl) e non (ctr) è stata monitorata la crescita delle radici primarie, laterali e laterali-laterali prendendo nota dell'andamento dello sviluppo radicale per ogni singola pianta.

Al nono giorno di esperimento le piantine sono state collezionate, fotografate e l'apparato radicale di ciascuna pianta separato dalla componente aerea e congelato.

Le misurazioni dell'accrescimento di ogni singola radice sono state condotte sulle immagini digitali ottenute (Fig. 4.6), utilizzando il programma informatico ImageJ. I dati numerici sono quindi stati rielaborati e sottoposti ad indagine statistica in modo da valutare la significatività di eventuali differenze nello sviluppo radicale di piante silenziate per i geni di interesse rispetto al controllo *gus*-RNAi, in condizioni controllo (ctr) e di stress salino (NaCl 100 mM).

Purtroppo, la grande variabilità nella crescita radicale, anche all'interno delle stesse piante controllo (*gus*-RNAi), non ha permesso di ottenere risultati statisticamente validi, come mostrato nell'analisi di figura 4.7. Dai grafici, si può solo evidenziare un lieve ma significativo aumento

nella crescita delle radici primarie di piante *aoc*-RNAi in presenza di stress (NaCl) (Fig. 4.7A). Tale dato è correlato inoltre da una minore crescita nelle radici laterali-laterali delle stesse piante sia in condizioni controllo che in presenza di sale (Fig. 4.7C).

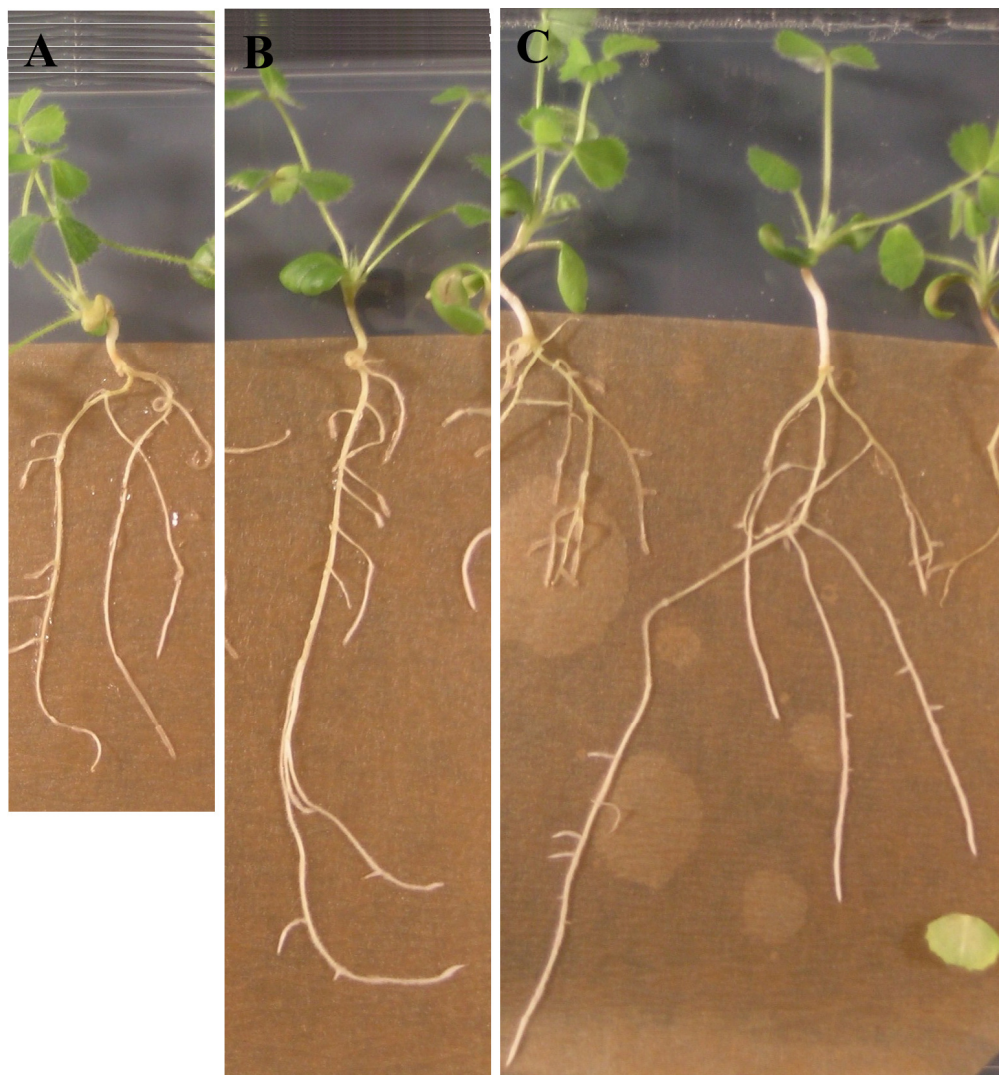


Figura 4.6 Piante composite *gus*-RNAi (A), *aos*-RNAi (B) e *aoc*-RNAi (C) cresciute in vitro sulle quali è stata monitorata giornalmente la crescita della radici primarie, laterali, e laterali-laterali.

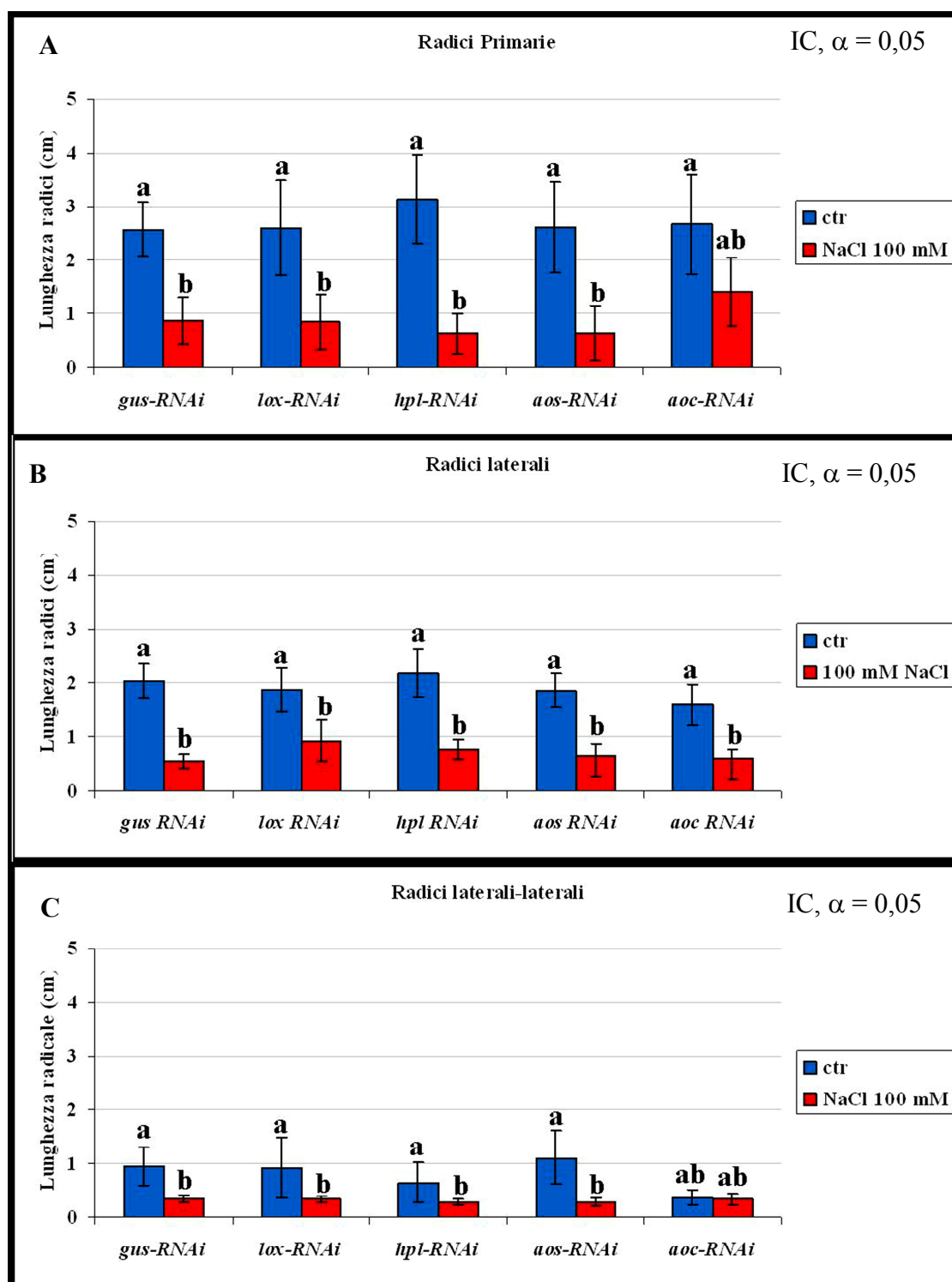


Figura 4.7 Analisi statistica effettuata mediante il test di Kruskal-Wallis e il test di Dunn-Sidak sulle lunghezze (cm) di radici primarie (A), laterali (B) e laterali-laterali (C) di piante composite *gus-RNAi*, *lox-RNAi*, *hpl-RNAi*, *aos-RNAi* e *aoc-RNAi* cresciute in vitro in assenza (ctr) ed in presenza (NaCl) di stress per 8 giorni. Sono state sottoposte ad analisi 13 piante *gus-RNAi*, 22 *lox-RNAi*, 21 *hpl-RNAi*, 23 *aos-RNAi* e 16 *aoc-RNAi* cresciute in condizioni controllo; 9 *gus-RNAi*, 21 *lox-RNAi*, 19 *hpl-RNAi*, 14 *aos-RNAi* e 25 piante *aoc-RNAi* cresciute invece in presenza di sale. I valori indicati con lettere differenti indicano una differenza significativa ($P < 0,05$), mentre quelli indicati con la stessa lettera mostrano un valore statisticamente simile. IC, intervallo di confidenza ($\alpha = 0,05$).

4.1.7 Esperimenti in serra

Data la grande variabilità nello sviluppo radicale delle piante cresciute in vitro e quindi la mancanza di risultati attendibili ottenuti da tali esperimenti, si è deciso di condurre gli esperimenti in serra. Le piante di *M. truncatula*, precedentemente infettate e selezionate in vitro, sono state quindi trasferite in vasi contenenti terreno sintetico (perlite e sabbia) e messe a crescere ad una temperatura di 24 °C e con un fotoperiodo luce/buio di 18/6 ore. In tal modo, è stato possibile valutare lo sviluppo dell'intero apparato radicale, misurando la lunghezza dello stesso e il residuo secco di radici e della componente aerea di ciascuna pianta.

Le piantine composite sono state quindi separate in due gruppi: una parte è stata utilizzata come controllo e non è stata sottoposta a stress, un'altra parte è stata trattata con una soluzione 100 mM NaCl due giorni dopo il trasferimento in vaso. Trascorsi 15 giorni dall'induzione dello stress le piante sono state collezionate, fotografate (Fig. 4.8A-B) e la parte aerea separata dalla parte radicale. Le immagini digitali ottenute sono state utilizzate per misurare la lunghezza dell'intero apparato radicale di ciascuna pianta, con l'impiego del programma informatico ImageJ; i dati numerici sono stati quindi rielaborati statisticamente.

Da ciò è emerso che in condizioni normali (ctr) il silenziamento dei geni non determina alcun cambiamento significativo nell'accrescimento radicale. In presenza di stress (NaCl) invece, la diminuzione nell'accrescimento radicale di piante *lox*-RNAi e *hpl*-RNAi è equiparabile alla crescita radicale delle piante controllo *gus*-RNAi, mentre un maggiore allungamento dell'apparato radicale si osserva in piante *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi, la cui lunghezza è paragonabile a quella del rispettivo controllo cresciuto in assenza di sale (ctr) (Fig. 4.8C).

Tali risultati sono stati inoltre confermati dalla valutazione del residuo secco dell'apparato radicale e fogliare di ciascuna pianta presa in esame. Le radici e le componenti aeree di ciascuna pianta sono state quindi pesate prima e dopo averle poste in stufa per determinare il residuo secco. I dati di figura 4.9A mostrano che in condizioni di stress si ha una minore riduzione in massa per radici *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi, a conferma dei dati sopra riportati.

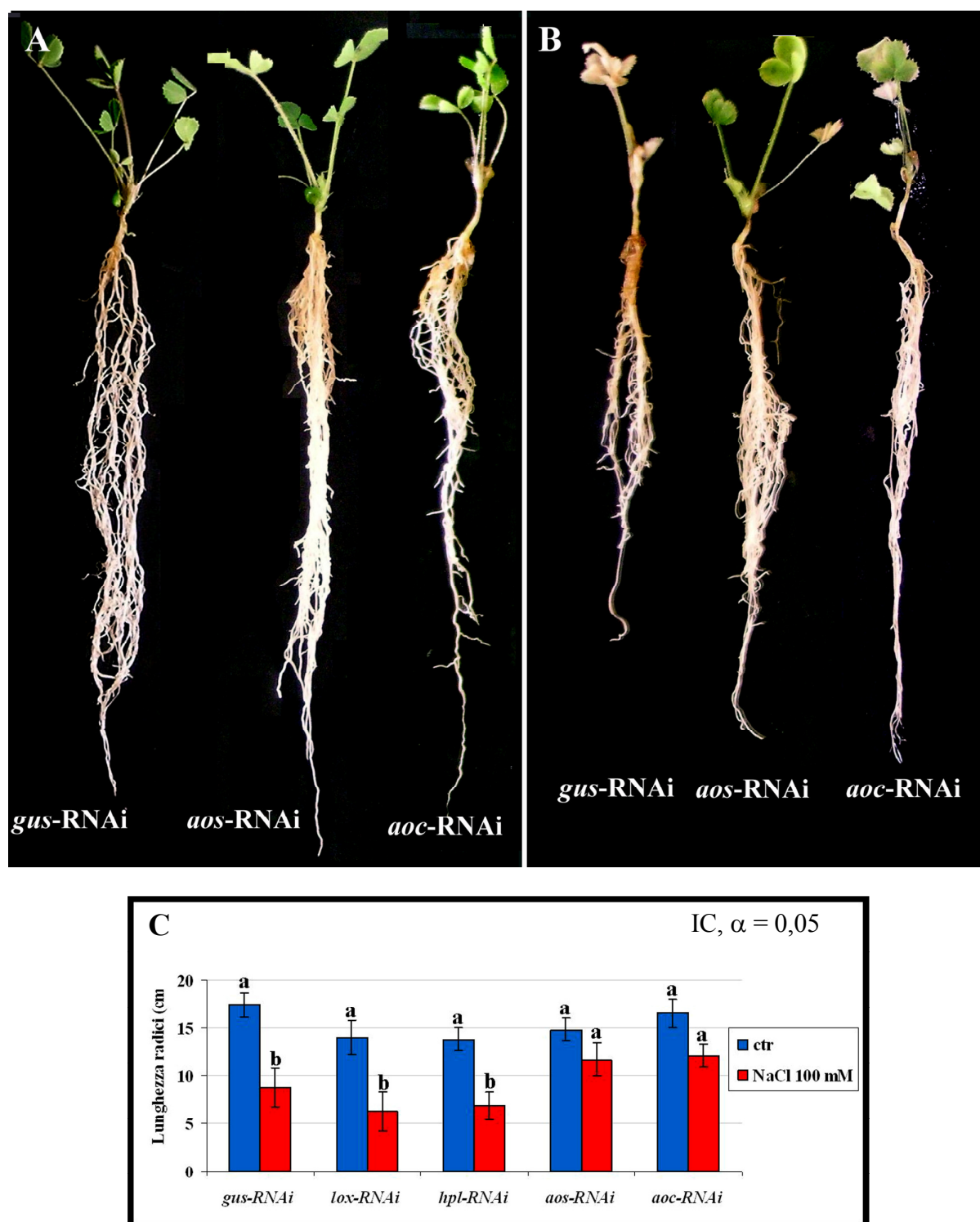


Figura 4.8 Esempi di piante *gus*-RNAi, *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi cresciute in assenza (A) ed in presenza di NaCl (B) collezionate e fotografate a 15 giorni dall'induzione dello stress salino (100 mM NaCl). (C) Lunghezze radicali (cm) delle piante *gus*-RNAi, *lox*-RNAi, *hpl*-RNAi, *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi cresciute in presenza (NaCl) ed in assenza (ctr) di stress per 15 giorni. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test di Kruskal-Wallis e il test di Dunn-Sidak. I valori indicati con lettere differenti indicano una differenza significativa ($P < 0,05$), mentre quelli indicati con la stessa lettera mostrano un valore statisticamente simile. IC, intervallo di confidenza ($\alpha = 0,05$).

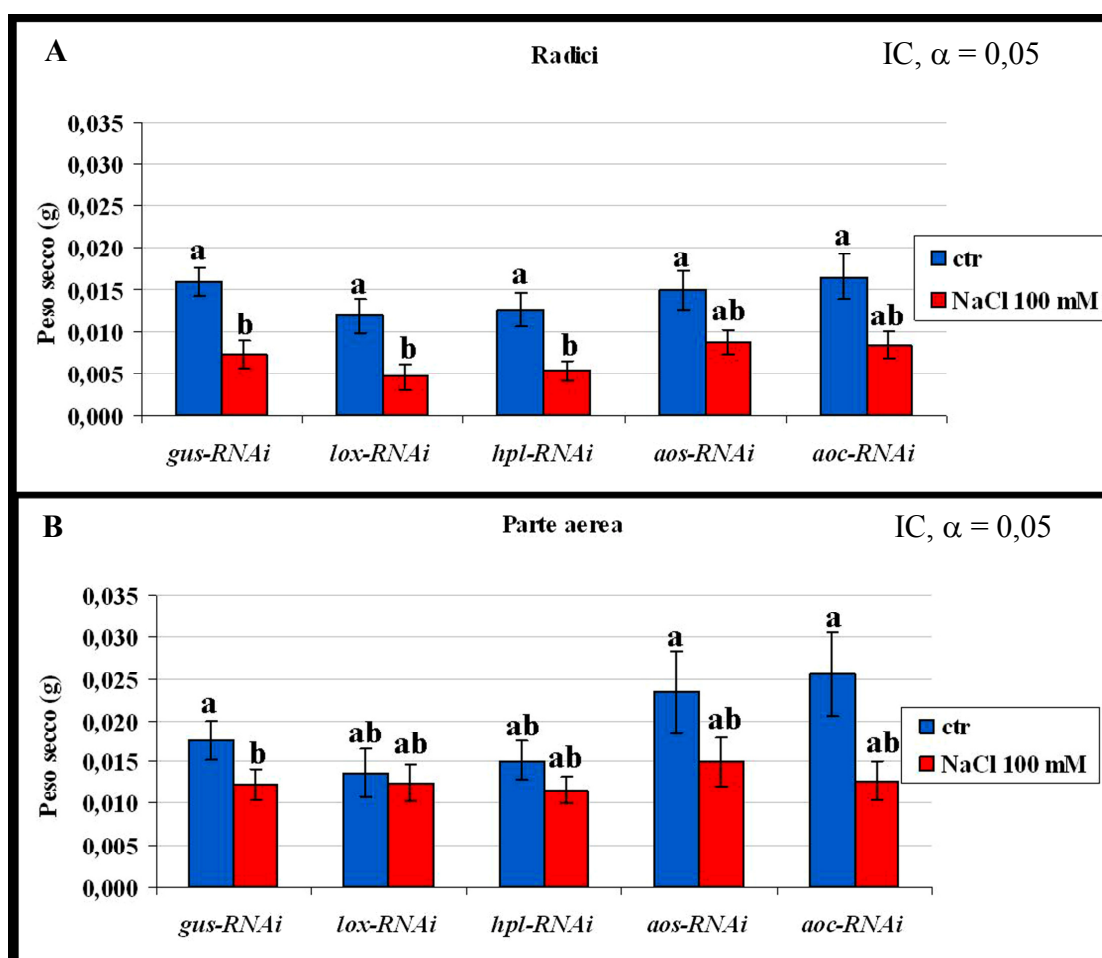


Figura 4.9 Analisi statistica effettuata mediante il test di Kruskal-Wallis e il test di Dunn-Sidak sul peso secco dell'apparato radicale (**A**) e della porzione aerea (**B**) di piante composite *gus-RNAi*, *lox-RNAi*, *hpl-RNAi*, *aos-RNAi* e *aoc-RNAi* cresciute in serra in assenza (ctr) ed in presenza di stress (NaCl) per 15 giorni. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test di Kruskal-Wallis e il test di Dunn-Sidak. I valori indicati con lettere differenti indicano una differenza significativa ($P < 0,05$), mentre quelli indicati con la stessa lettera mostrano un valore statisticamente simile. IC, intervallo di confidenza ($\alpha = 0,05$).

4.1.8 Analisi *real time* RT-PCR dei livelli di espressione genica

Per verificare l'efficienza del *gene-silencing*, i livelli di espressione di ciascun gene sono stati analizzati mediante *real-time* RT-PCR in piante controllo *lox*-RNAi, *hpl*-RNAi, *aos*-RNAi e *aoc*-RNAi cresciute in serra.

Parte del materiale vegetale radicale è stato congelato e quindi processato per estrarne l'RNA totale. Da qui si è proceduto con la sintesi del cDNA, utilizzando come primer un oligo (dT). L'esperimento di *real time*-PCR, è stato condotto utilizzando l'actina come gene *housekeeping* e primer opportunamente disegnati in regioni conservate di ciascun gene.

Da tali esperimenti è emerso che, mentre i geni *aoc* e *aos* sono effettivamente sotto-regolati a livello radicale nelle piante prese in esame, il silenziamento dei geni *hpl* e soprattutto *lox* non sembra avere una buona efficienza (Fig. 4.10). Nel genoma di *Medicago truncatula* infatti, sono state stimate circa quindici geni di lipossigenasi; la bassa efficienza di silenziamento potrebbe perciò essere dovuto alla loro presenza e potrebbe spiegare la mancanza di risultati ottenuti su piante composite *lox*-RNAi.

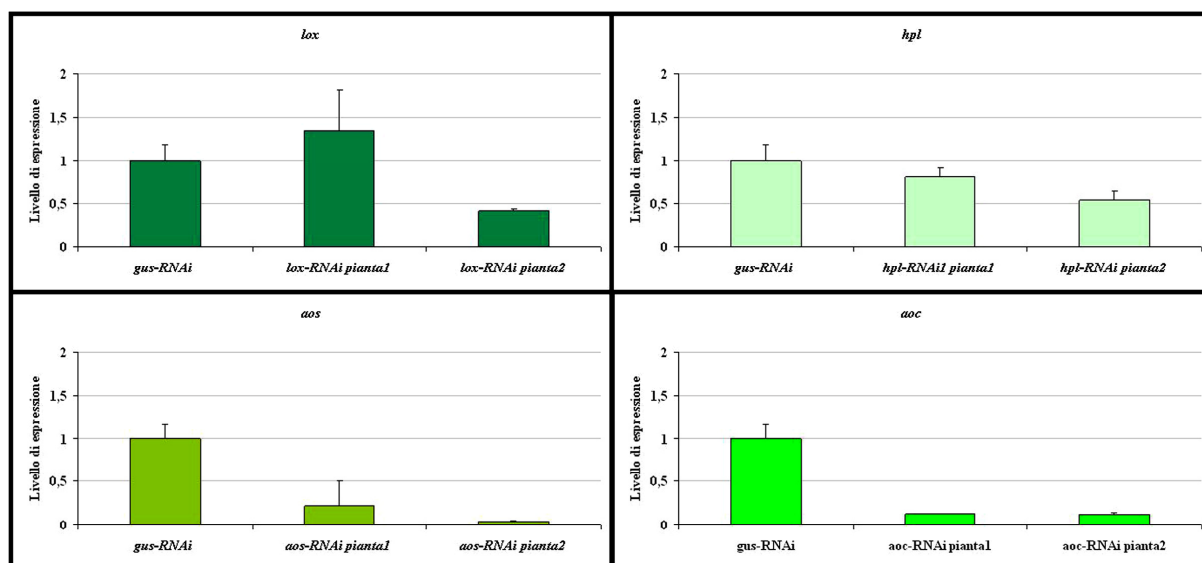


Figura 4.10 Analisi *real-time* RT-PCR di livelli di espressione dei geni *lox*, *hpl*, *aos* e *aoc* in radici di differenti piante composite cresciute in serra e non sottoposte a stress. I valori sono stati normalizzati con il gene codificante per l'actina e radici di piante *gus*-RNAi costituiscono il controllo per ciascun gene. La barra di errore rappresenta l'intervallo di confidenza ($\alpha = 0,05$) tra tre repliche tecniche.

4.2. STRESS IDRICO (SICCITA')

4.2.1 Induzione di stress idrico su piante di *Cicer arietinum* cresciute in serra

Semi di cece (*Cicer arietinum*) tolleranti (genotipo ICC 4958) e sensibili (ICC 1882) alla siccità sono stati acquistati dall'ICRISAT (*International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, Patancheru, Hyderabad, India) e, dopo vernalizzazione, sono stati seminati in terra e fatti crescere per tre settimane in serra.

Nelle tre settimane di crescita, le piante sono state irrigate ogni giorno con 100 ml di acqua in modo da uniformare il grado di idratazione del terreno. Due giorni dopo l'ultima somministrazione di acqua, l'irrigazione è stata sospesa e per ciascun tempo di stress (0, 2, 24, 48 e 72 ore) tre piante per ciascun genotipo sono state collezionate, fotografate e congelate.

Da una prima analisi fenotipica, le piantine ICC 1882 (sensibili alla siccità) presentano l'ingiallimento e l'inibizione dell'espansione fogliare già a brevi tempi di stress (2 e 24 ore), mentre le piante ICC 4958 (tolleranti alla siccità) possiedono caratteristiche morfologiche che ne determinano la resistenza, come un apparato radicale più lungo e voluminoso, rispetto alla varietà sensibile (Fig. 4.11).



Figura 4.11 Piante di *Cicer arietinum* genotipo ICC 4958 (tollerante alla siccità) (A) e ICC 1882 (sensibile) (B) collezionate a 2 ore di induzione dello stress idrico.

4.2.2 Determinazione dello contenuto in acqua, in clorofilla ed in acido abscissico di piante sottoposte a siccità

In una prima analisi condotta sulle piante di *C. arietinum* è stata monitorata la risposta delle piante allo stress indotto. A tal proposito è stato valutato il contenuto in acqua (RWC, *Relative Water Content*), la concentrazione di clorofilla nelle parti verdi ed il contenuto di acido abscissico (ABA) a livello radicale delle piante ICC 4958 e ICC 1882 sottoposte a differenti tempi di siccità.

Per ciascuna pianta, la parte aerea è stata privata dell'apparato radicale. Una parte dell'epigeo è stato congelato, macinato ed utilizzato per l'estrazione delle clorofille, mentre la restante porzione è stata impiegata per misurare il RWC (%).

RWC può essere considerato il principale meccanismo di adattamento della pianta in condizioni di deficit idrico e riflette i cambiamenti osmotici che vi si verificano. I tessuti verdi sono stati pesati, reidratati in acqua per 24 ore e posti in stufa per 48 ore per ottenere rispettivamente il peso fresco, il peso turgido ed il peso secco, necessari per calcolare l'RWC%. Per ciascun tempo di stress sono state calcolate le medie dei valori misurati nei tre campioni collezionati a ciascun tempo e quindi le relative deviazioni standard. Entrambi i genotipi presentano un contenuto in acqua paragonabile sino alle 48 ore di stress (intorno al 70% e 60% a 2 ore e 48 ore rispettivamente). Ciò potrebbe indicare che entrambe le cultivar, nel primo periodo di stress, cercano di contrastare la disidratazione aumentando il trasporto di acqua verso le foglie oppure attivando la sintesi di osmoliti. Dopo questo primo periodo di leggero decremento in entrambe le linee, a 72 ore si assiste ad una brusca diminuzione di idratazione nel genotipo sensibile (ICC 1882), con un contenuto in acqua inferiore di circa il 20% rispetto alla varietà tollerante, ICC 4958, che presenta solo una lieve diminuzione di RWC rispetto alle 48 ore (Fig. 4.12A).

Il contenuto in clorofille è stato ottenuto mediante dosaggio spettrofotometrico, per determinare il contenuto in clorofilla *a* e clorofilla *b*. Le letture sono state effettuate su tre campioni per ciascun tempo di stress (0, 2, 24 48 e 72 ore). I valori ottenuti sono stati utilizzati per calcolare il contenuto totale di clorofille. Il contenuto in clorofilla è indice della capacità fotosintetica ed una sua diminuzione è segno di una sofferenza dell'organismo. Dalla figura 4.12B si evince che entrambe le linee presentano una capacità fotosintetica paragonabile nelle prime 24 ore di stress, con un leggero aumento a 2 ore ed un successivo decremento alle 24 ore di stress. A tempi più lunghi invece il genotipo tollerante sembra mantenere una migliore capacità fotosintetica della linea sensibile.

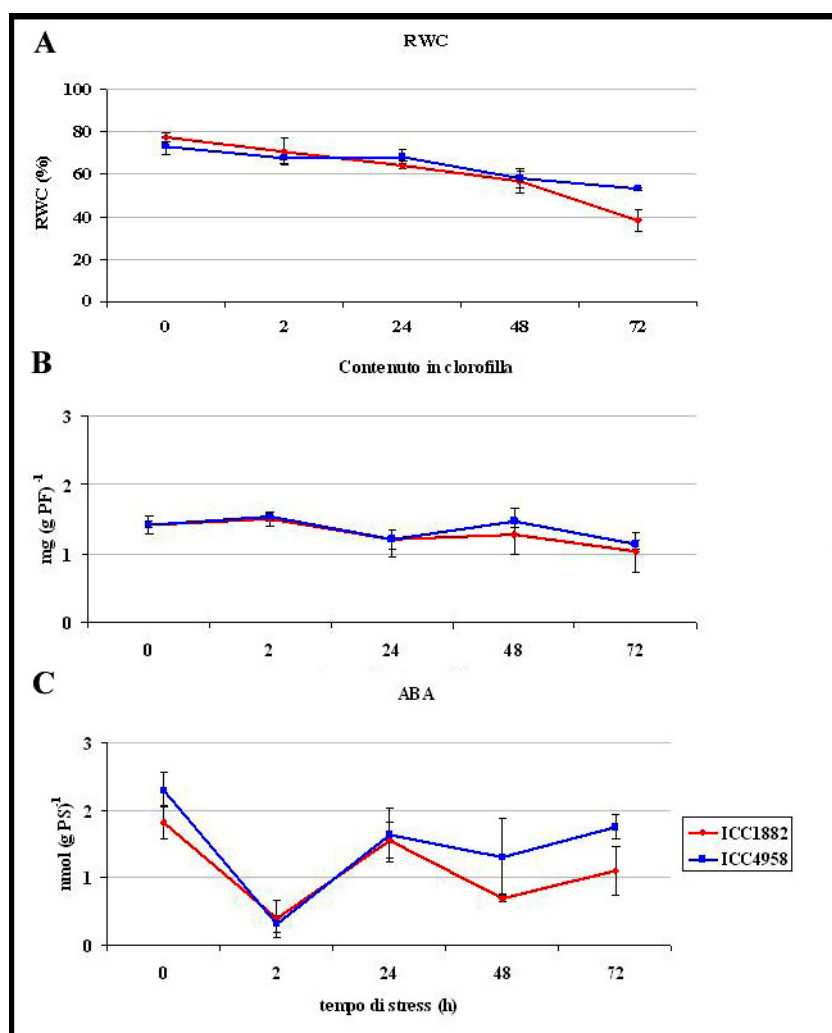


Figura 4.12 Determinazione del *Relative Water Content* (RWC) in percentuale (A) e del contenuto totale in clorofilla (espresso come mg/g di peso fresco) (B) in foglie di piante di *C. arietinum* sensibili (ICC 1882) e tolleranti alla siccità (ICC 4958), sottoposte a stress idrico per 0 ore (controllo), 2, 24, 48 e 72 ore. (C) andamento del contenuto in acido abscissico (ABA) espresso in nmoli/g di peso secco (PS) nelle radici delle due cultivar di cece, nei diversi tempi di siccità.

L'acido abscissico (ABA) infine è un regolatore chiave dei geni coinvolti nella risposta alla disidratazione. L'andamento nell'accumulo di questo ormone nei due genotipi risulta abbastanza simile: dopo una sua diminuzione a 2 ore di stress, si registra un aumento alle 24 ore, dimostrando così un coinvolgimento del fitormone nella risposta allo siccità (Fig. 4.12C), ed in particolare i livelli di ABA risultano essere maggiori nel genotipo tollerante (ICC 4958) a tempi di disidratazione più lunghi (a 72 ore risultano essere il 37% più alti rispetto a ICC 1882).

Tale analisi preliminare ha confermato quindi, in queste condizioni sperimentali, una maggiore tolleranza allo stress idrico da parte delle piante del genotipo tollerante ICC 4958.

4.2.3 Analisi *real-time* dell'espressione dei geni *lox*, *hpl*, *aos*, *aoc*, α -*dox* e *opr* a livello radicale in piante di *Cicer arietinum* sottoposte a stress

Gli apparati radicali, opportunamente conservati a -80 °C, sono stati utilizzati per l'analisi dell'espressione dei geni coinvolti nella via metabolica delle ossilipine mediante esperimenti di *real time* RT-PCR.

Dai tessuti radicali di ciascuna pianta è stato quindi estratto l'RNA totale; l'intero trascrittoma di ciascun campione è stato quindi retrotrascritto ed impiegato per analizzare quantitativamente l'espressione dei geni di interesse: *lox*, *hpl*, *aos*, *aoc*, *opr*, α -*dox*. I geni *lox* e *hpl* in particolare sono stati analizzati nelle due isoforme denominate: *lox1* e *lox2*, *hpl1* e *hpl2*. I primer utilizzati in questo esperimento sono stati disegnati a seguito dei risultati ottenuti in un precedente lavoro (Molina e coll., 2011) e sono stati sintetizzati da Genxpro (Germania) sulla base un'analisi di deepSuperSAGE a mezzo della quale è stata studiata la risposta trascrittomica di radici di cece sottoposte a stress salino.

Tali UniTag sono state utilizzate come sonde fluorescenti nell'analisi di *real-time*-PCR. I valori numerici forniti dal *software* (CT) sono espressi in relazione al campione calibratore (il controllo, tempo 0) che rappresenta la quantità unitaria del gene di interesse; gli altri campioni, riferiti a 2, 24, 48 e 72 ore di stress idrico, sono espressi come *n*-volte il calibratore. L'amplificazione del gene codificante per la β -tubulina, espresso in modo costitutivo, è necessaria per normalizzare i valori relativi ai campioni sottoposti ad analisi. I valori sono stati ottenuti calcolando le quantità relative (RQ) rispetto al calibratore ed i dati riportati sono il risultato della media delle tre misurazioni per ogni campione, con le rispettive deviazioni standard.

Dalle analisi condotte è emerso che le due isoforme del gene *lox* mostrano una differente espressione nei due genotipi, in risposta allo stress idrico. Infatti, *lox1* sembra essere sovra-espressa nel genotipo sensibile (ICC 1882) a partire dalle 24 ore e con un andamento non costante e sembra essere sotto-espressa nella tollerante (Fig. 4.13A); l'isoforma *lox2* invece viene sovra-espressa nel genotipo tollerante (ICC 4958) già a poche ore dall'induzione della siccità (2-24 ore) ed è sottoregolata nel genotipo sensibile (Fig. 4.13B).

Anche le due isoforme del gene *hpl* sembrano essere entrambe sovra-esprese in ICC 4958. In particolare, *hpl1* viene sovra-espresso già a 2 ore dallo stress con un andamento costante (Fig. 4.13C) mentre *hpl2* presenta un andamento crescente con un massimo a 72 ore (Fig. 4.13D). Anche nella linea sensibile (ICC 1882) si osserva un aumento nel tempo dei livelli di espressione delle due isoforme, tale aumento però risulta più contenuto e più tardivo (dopo le 48 ore

dall'inizio dello stress). Tali dati portano a dedurre un possibile coinvolgimento delle idroperossidi liasi nella risposta della pianta alla siccità, già nelle prime ore dalla sua induzione. Il gene codificante per la α -dox invece non presenta alcun incremento nella sua espressione, infatti in entrambi i genotipi è sotto-regolato durante lo stress (Fig. 4.13E).

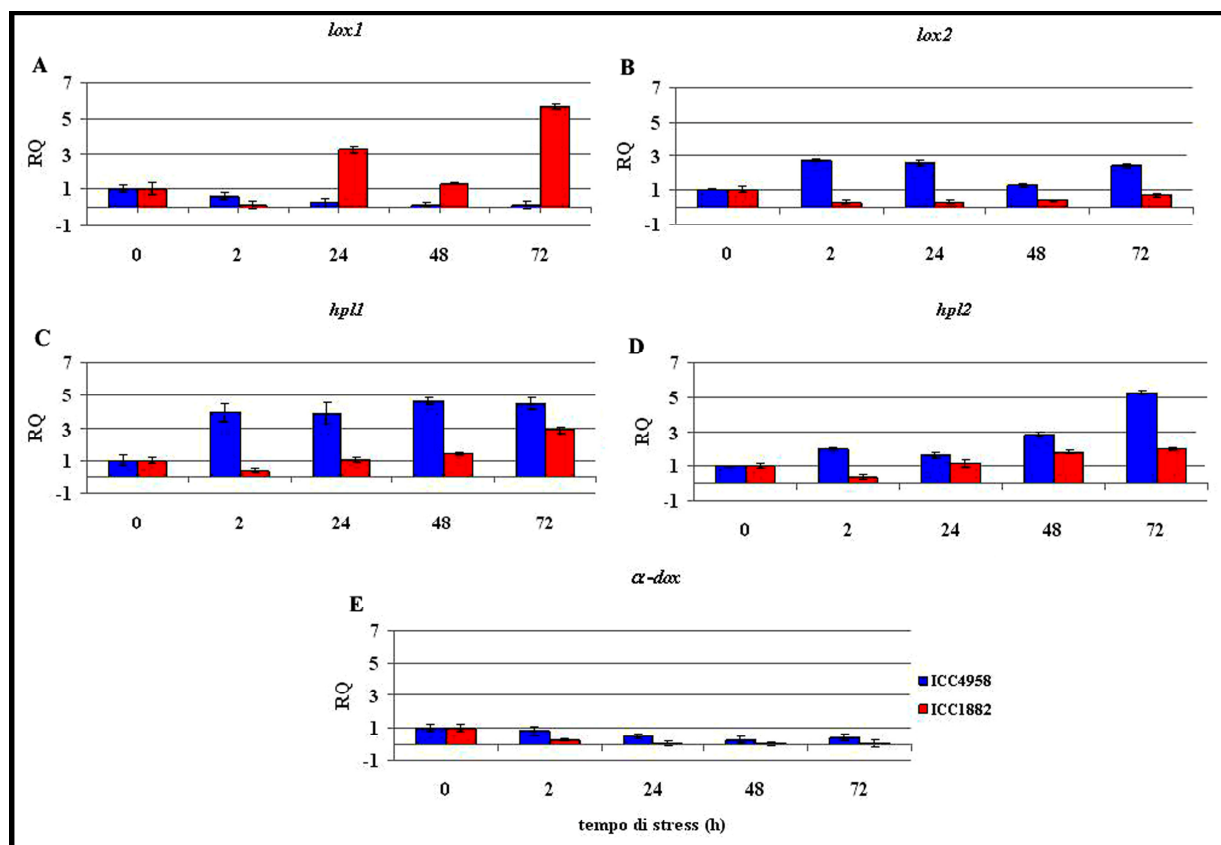


Figura 4.13 Analisi *real time* RT-PCR delle due isoforme del gene che codifica per la lipossigenasi, *lox1* (A) e *lox2* (B), delle due isoforme geniche codificanti per idroperossidi liasi, *hpl1* (C) e *hpl2* (D) e del gene α -dox (E) su piante di cece genotipo ICC 4958 (tollerante) e ICC 1882 (sensibile) sottoposte a stress idrico per 0 (controllo), 2, 24, 48 e 72 ore. RQ, quantità relativa.

Per quanto riguarda i geni *aos* e *aoc*, direttamente coinvolti nella sintesi di acido jasmonico, nel genotipo tollerante (ICC 4958) è stata riscontrata una sovra-espressione del gene *aos*, che presenta un incremento di circa 19 volte superiore rispetto al controllo, già a 2 ore di stress e che rimane tuttavia sovra-espresso sino alle 72 ore. Tale gene inoltre viene sotto-espresso nella linea sensibile per tutto il periodo di siccità (Fig. 4.14A).

Nessun cambiamento significativo è stato invece apprezzato nell'espressione del gene *aoc* (Fig. 4.14B); mentre una notevole sovra-espressione del gene *opr* si ha in entrambi i genotipi della leguminosa a partire da brevi tempi di stress (2 ore). Nella linea tollerante ICC 4958 in particolare (Fig. 4.14C) si ha un picco di espressione a 24 e 72 ore (circa 10 volte superiore rispetto al controllo).

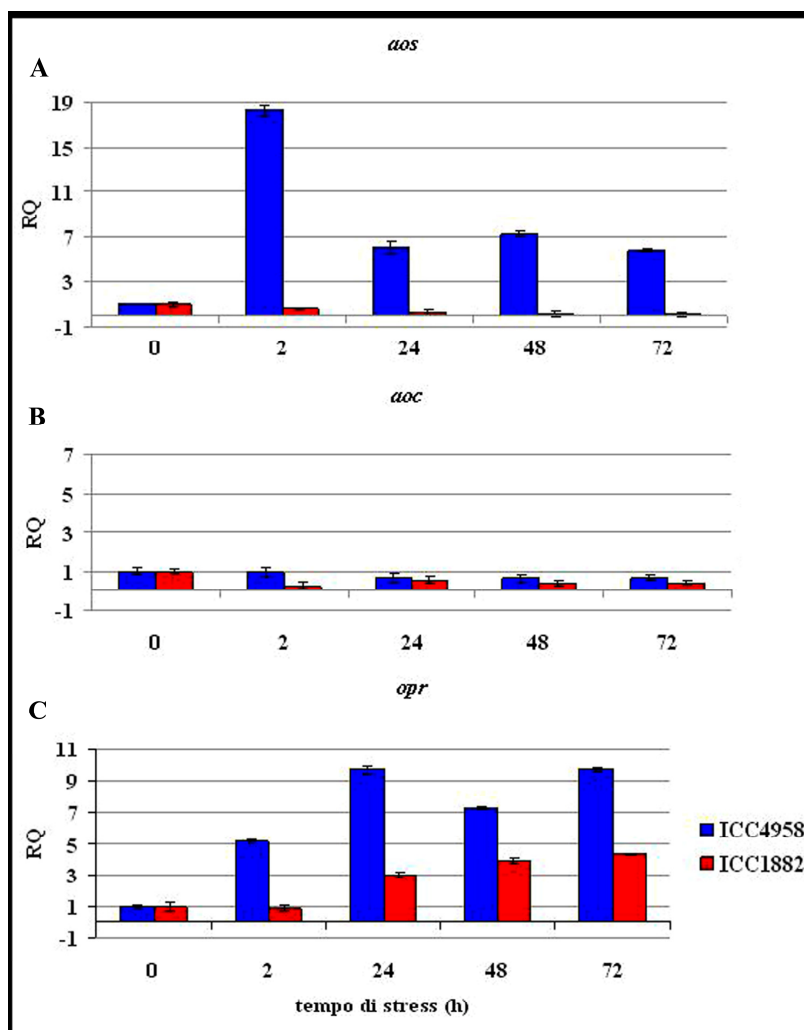


Figura 4.14 Analisi *real time* RT-PCR del gene allene ossido sintasi (A), allene ossido ciclastasi (B) e OPDA redattasi (C) su piante di cece ICC 4958 (tollerante) e ICC 1882 (sensibile) sottoposte a stress idrico per 0 (controllo), 2, 24, 48 e 72 ore. RQ, quantità relativa.

4.2.4 Analisi dei prodotti del metabolismo delle ossilipine in HPLC

I risultati di espressione genica, sono stati quindi avvalorati analizzando la presenza e la quantità di alcune molecole prodotte dagli enzimi coinvolti nel metabolismo delle ossilipine. I campioni di radici su cui è stato condotto l'esperimento di *real time* PCR, sono stati utilizzati per l'estrazione chimica e l'analisi quantitativa in HPLC.

Per quanto riguarda il contenuto in idroperossidi degli acidi grassi (*Total HFA*, *Total Hydroperoxide Fatty Acid*) a livello radicale si è osservato un picco alle 24 ore di stress per il genotipo sensibile, mentre per il genotipo tollerante i livelli di HFA aumentano gradualmente sino le 72 ore di siccità (Fig. 4.15).

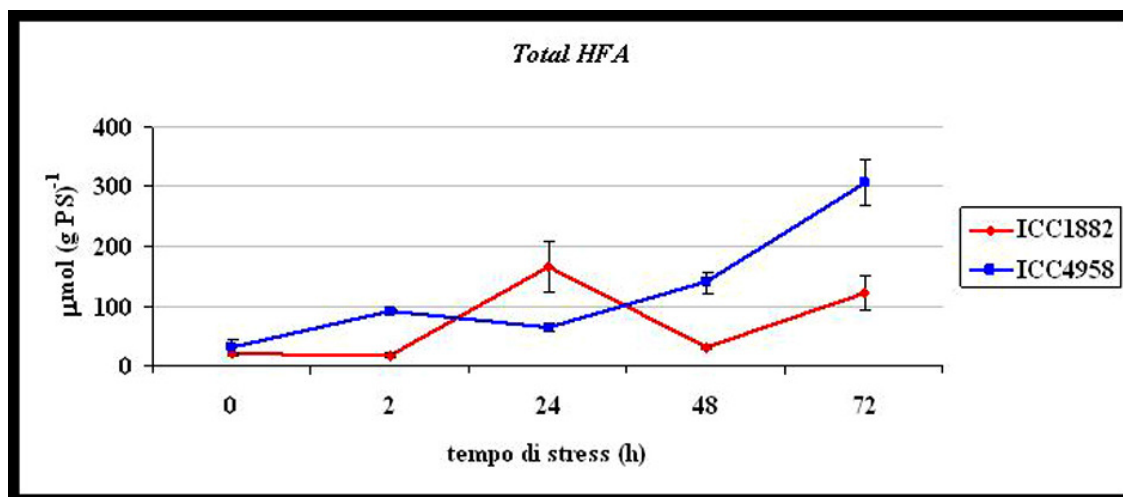


Figura 4.15 Analisi HPLC di idroperossidi totali degli acidi grassi (*Total HFA*) estratti da radici di cece tollerante (ICC 4958) e sensibile (ICC 1882) allo stress idrico, sottoposte a siccità per 0, 2, 24, 48 e 72 ore. PS, peso secco.

Si è proceduto quindi con l'analisi dei metaboliti posti a valle della via biosintetica.

Per quanto riguarda le aldeidi, non sono state registrate in queste condizioni sperimentali aldeidi C-9 (nonenale), mentre per le aldeidi C-6 (esanale) non si sono osservate delle sostanziali differenze nelle due varietà (Fig. 4.16), con l'esclusione di un picco di accumulo nel genotipo sensibile ICC 1882 a 48 ore di induzione di stress.

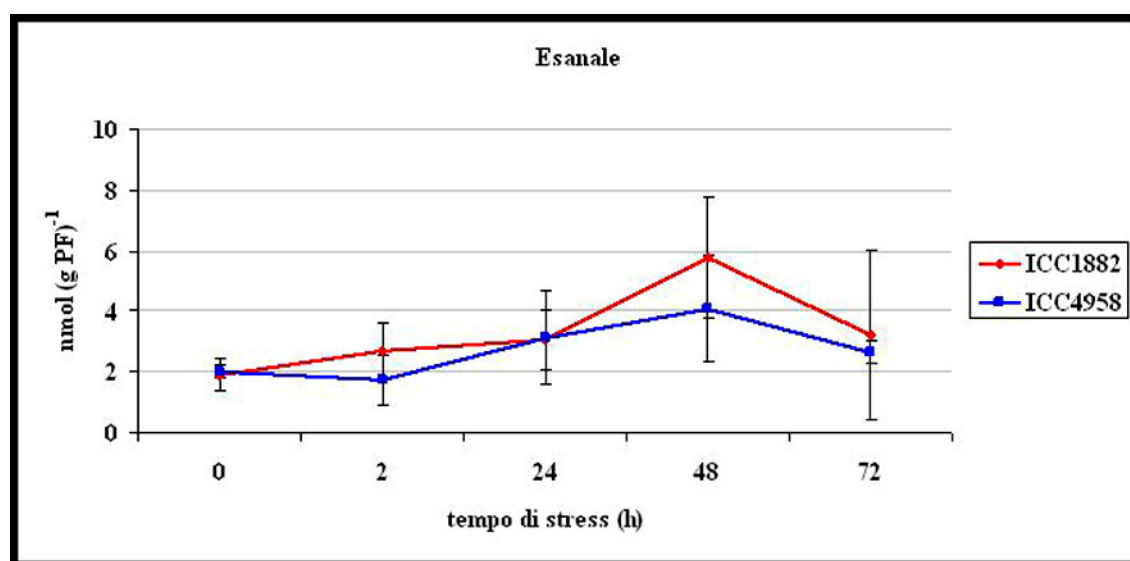


Figura 4.16 Analisi HPLC di aldeidi C-6 in radici di cece ICC 4958 (tollerante) e ICC 1882 (sensibile) sottoposte a stress idrico per 0, 2, 24, 48, 72 ore.

Un accumulo di OPDA (precursore dell'acido jasmonico), JA e JA-Ile (jasmonoil-isoleucina, una sua forma attiva) è stato invece osservato nelle radici di cece tolleranti alla siccità (ICC 4958) nelle prime fasi dell'induzione dello stress, fino a 24 ore (Fig. 4.17). In particolare, i livelli di tali molecole risultano più alti nella varietà tollerante, rispetto alla sensibile. Per esempio i livelli osservati per OPDA nel genotipo ICC 1882 in condizioni controllo sono più alti rispetto a quelli del tollerante; a 2 ore di stress tuttavia si osserva una loro diminuzione nella varietà sensibile ed un incremento nella tollerante (circa 2 nmoli per grammo di peso secco radicale) (Fig. 4.17A).

JA presenta bassi livelli di accumulo in ICC 1882 sino alle 24 ore, aumentando sino a 1 nmoli per grammo di peso secco a 48 ore. Nel genotipo tollerante invece presenta un picco di 6 nmoli per grammo di peso secco alle 24 ore (Fig. 4.17B).

Infine, i livelli di JA-Ile sono costitutivamente più alti in ICC 4958 (0,3 nmoli per grammo di peso secco contro le 0,05 nmoli per grammo di peso secco in ICC 1882) ed aumentano a 2 ore di stress in entrambe le cultivar (Fig. 4.17C).

Tali molecole derivano dall'azione a cascata dei geni lipossigenasi, allene ossido sintasi, allene ossido ciclastasi e OPDA redattasi ed il loro accumulo costituisce quindi una conferma dell'aumentata espressione dei geni *lox*, *aos* e *opr* osservata in esperimenti di *real time*-PCR nel

genotipo tollerante. L'assenza di una sovra-espressione del gene *aoc* sembra quindi non influire sull'accumulo di tali metaboliti, almeno nelle prime ore di stress.

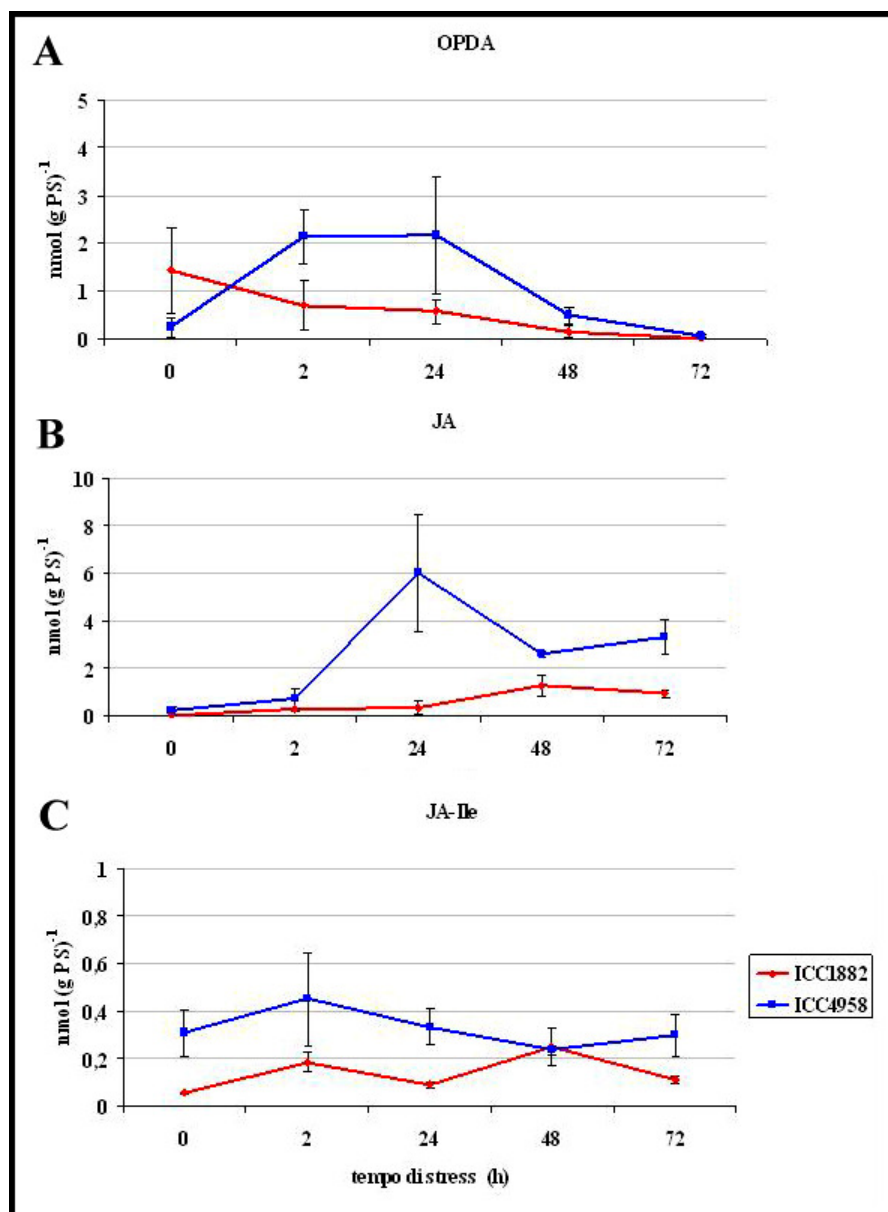


Figura 4.17 Analisi in HPLC dei prodotti del metabolismo delle ossilipine OPDA (A), acido jasmonico (B) e jasmonoil-isoleucina (C) estratti da radici di piante ICC 4958 e ICC 1882 nel corso dello stress idrico. I valori sono espressi in nmoli/g di peso secco (PS).

4.3 ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE CELLULARE

4.3.1 Localizzazione endocellulare degli enzimi del metabolismo delle ossilipine: LOX, HPL, AOS e AOC

La rapida attivazione del metabolismo delle ossilipine durante le prime fasi di risposta della pianta allo stress indica che i principali enzimi della via metabolica sono già presenti nella cellula vegetale. Lo studio della loro localizzazione cellulare risulta pertanto particolarmente importante per verificare la disponibilità dei substrati per l'attività catalitica dei vari enzimi operanti in una via biosintetica complessa come quello delle ossilipine vegetali.

Piantine di *M. truncatula*, cresciute per 15 giorni in vitro, sono state utilizzate per esperimenti di localizzazione endocellulare degli enzimi coinvolti nelle due ramificazioni della via metabolica: LOX-HPL (biosintesi delle aldeidi) e LOX-AOS-AOC (biosintesi di jasmonati).

L'apparato aereo delle piantine è stato separato dalla radice e sottoposto a frazionamento sub-cellulare. Mediante una serie di centrifugazioni su gradienti di Percoll (Amersham-Pharmacia Biotech) e di saccarosio, i cloroplasti sono stati dapprima separati dalle altre componenti cellulari e quindi suddivisi nelle seguenti frazioni: tilacoidale (Til), stromatica (Str), lamellare (Lam) e dei grana (Gra). Tali frazioni sono state quindi caricate su di un gel di poliacrilammide insieme ad una frazione totale (Tot) e cloroplastidiale totale (Clor).

Tramite analisi *western blot*, utilizzando anticorpi specifici per ciascuna proteina, è stata evidenziata la distribuzione endocellulare illustrata in figura 4.18. L'utilizzo di anticorpi specifici per le proteine AOC, AOS e LOX di *Solanum tuberosum*, che hanno una specificità di riconoscimento anche per proteine appartenenti ad altre specie (Farmaki e coll., 2007), ha evidenziato come atteso una distribuzione cloroplastidiale di tali enzimi.

In particolare, l'enzima lipossigenasi (*MtLOX*) presenta un segnale solo nella frazione totale del cloroplasto, *MtAOS* ha una distribuzione preferenzialmente lamellare (Fig. 4.18A), mentre *MtAOC* si ritrova a livello della superficie dei grana (Fig. 4.18B).

Utilizzando un anticorpo specifico per un idroperossido liasi di *M. truncatula* HPLF (De Domenico e coll., 2007) invece si è evidenziata una localizzazione dell'enzima nella sola frazione totale (Fig. 4.18A-B). Tale localizzazione appare strana, in quanto analisi bioinformatiche hanno evidenziato la presenza di un peptide di transito per il cloroplasto di 59 aminoacidi nella regione N-terminale (Fig. 4.19).

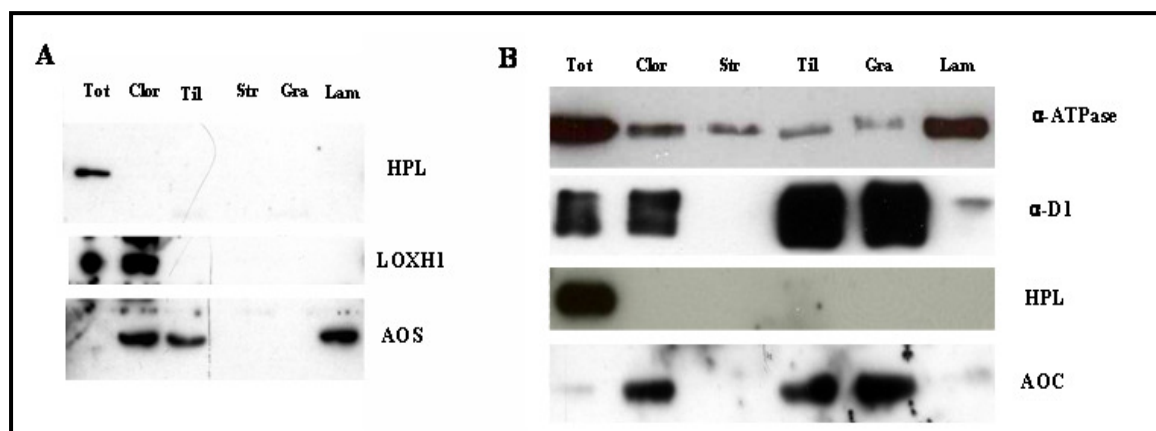


Figura 4.18 Frazionamento sub-cellulare di foglie di *M. truncatula*. Le frazioni totale (Tot), cloroplastidiale (Clor), stromatica (Str), tilacoidale (Til), lamellare (Lam) e dei grana (Gra) sono state sottoposte ad indagine *western blot* utilizzando gli anticorpi specifici per HPL di *M. truncatula* e per LOX, AOS e AOC di *Solanum tuberosum*. La purezza delle frazioni è stata confermata dall'utilizzo di anticorpi diretti contro un ATPase e una proteina D1 di *A. thaliana*.

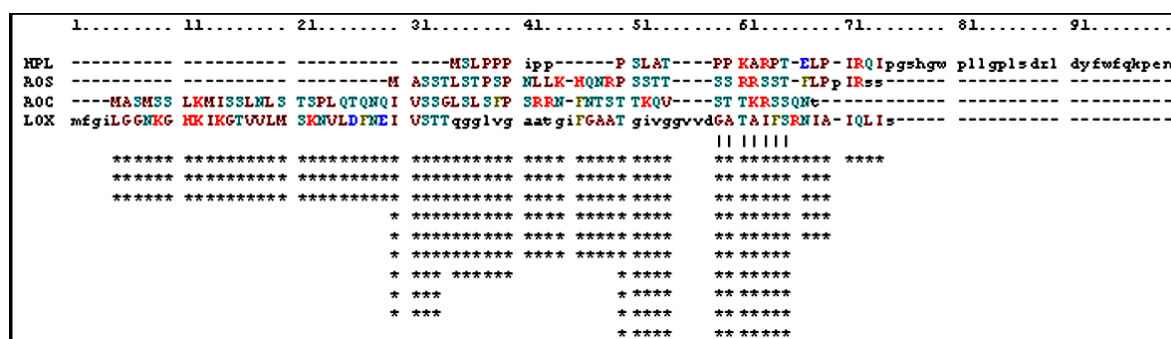


Figura 4.19 Allineamento delle sequenze aminoacidiche dei presunti peptidi di transito per il cloroplasto di HPL (59 aminoacidi), AOS (39 aminoacidi), AOC (59 aminoacidi) e LOX (74 aminoacidi) di *M. truncatula*. L'analisi è stata effettuata con il programma informatico "Genomatrix software suite" (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>).

4.3.2 Esperimenti di localizzazione endocellulare in protoplasti di tabacco

Per poter caratterizzare al meglio la localizzazione cellulare della HPL di *M. truncatula*, sono stati condotti esperimenti di microscopia confocale per osservare in vivo la distribuzione della proteina resa visibile dalla presenza di *tag* fluorescenti.

MtHPL, in esperimenti di *immunoblot* su piante wt, non presenta una localizzazione cloroplastidiale nonostante la presenza di un peptide di transito per il plastidio nella regione N-terminale. La proteina quindi è stata ingegnerizzata mediante tecniche di biologia molecolare per ottenere le seguenti tre proteine fluorescenti: HPL-YFP (la proteina fusa a monte della proteina fluorescente YFP), TP₅₉-GFP (il peptide di transito di 59 aminoacidi fuso alla proteina fluorescente GFP) e -HPL-GFP (la proteina HPL tronca, cioè priva del TP₅₉ e fusa alla GFP). Le sequenze codificanti per queste proteine ricombinanti sono state clonate in vettori di espressione ed i plasmidi utilizzati per trasformare protoplasti ottenuti dal mesofillo fogliare di piante di tabacco.

A seguito di osservazioni in microscopia confocale in fluorescenza sono stati ottenuti i seguenti *pattern* di localizzazione: la proteina HPL-YFP sembra si distribuisca in piccoli *spot* verdi osservabili sui cloroplasti (fluorescenza rossa) (Fig. 4.20A); la forma tronca (-HPL) è distribuita invece a livello di citosol, come evidenziato dalla presenza del segnale verde anche a livello di nucleo (Fig. 4.20B); il solo peptide di 59 aminoacidi infine presenta una distribuzione particolare, in ammassi cellulari che potrebbero essere assimilati a reticolo endoplasmico (RE) (Fig. 4.20C).

Tali osservazioni sono state quindi confermate da analisi *western blot* (Fig. 4.20D) condotte sulle frazioni cellulari (solubile, di membrana e plastidiale) estratte dai protoplasti trasformati ed utilizzando un anticorpo specifico per la proteina fluorescente GFP. Come controlli positivi, i filtri sono stati ibridati con anticorpi specifici per la proteina BiP, localizzata nel lumen del reticolo endoplasmico, e per la proteina plastidiali F1-ATPasi.

Nel complesso dall'analisi è emerso che la proteina *MtHPL*, localizzata a livello cloroplastidiale come supportato dalla presenza di un suo segnale nella frazione plastidiale (PF, Fig. 4.20D), quando è privata del suo peptide di transito non riesce a raggiungere i plastidi. -HPL-GFP presenta infatti una localizzazione citosolica, confermata da una banda di peso molecolare atteso nella frazione solubile (SF). In ultimo, un segnale di peso molecolare atteso nella frazione solubile (SF) dell'analisi *western* per il solo peptide di transito TP₅₉ e la mancanza di un segnale fluorescente nel nucleo per questa piccola proteina ricombinante di circa 34 kDa, sembrerebbero suggerire una localizzazione a livello di lumen del reticolo endoplasmico escludendo così una distribuzione citosolica (Fig. 4.20C-D).

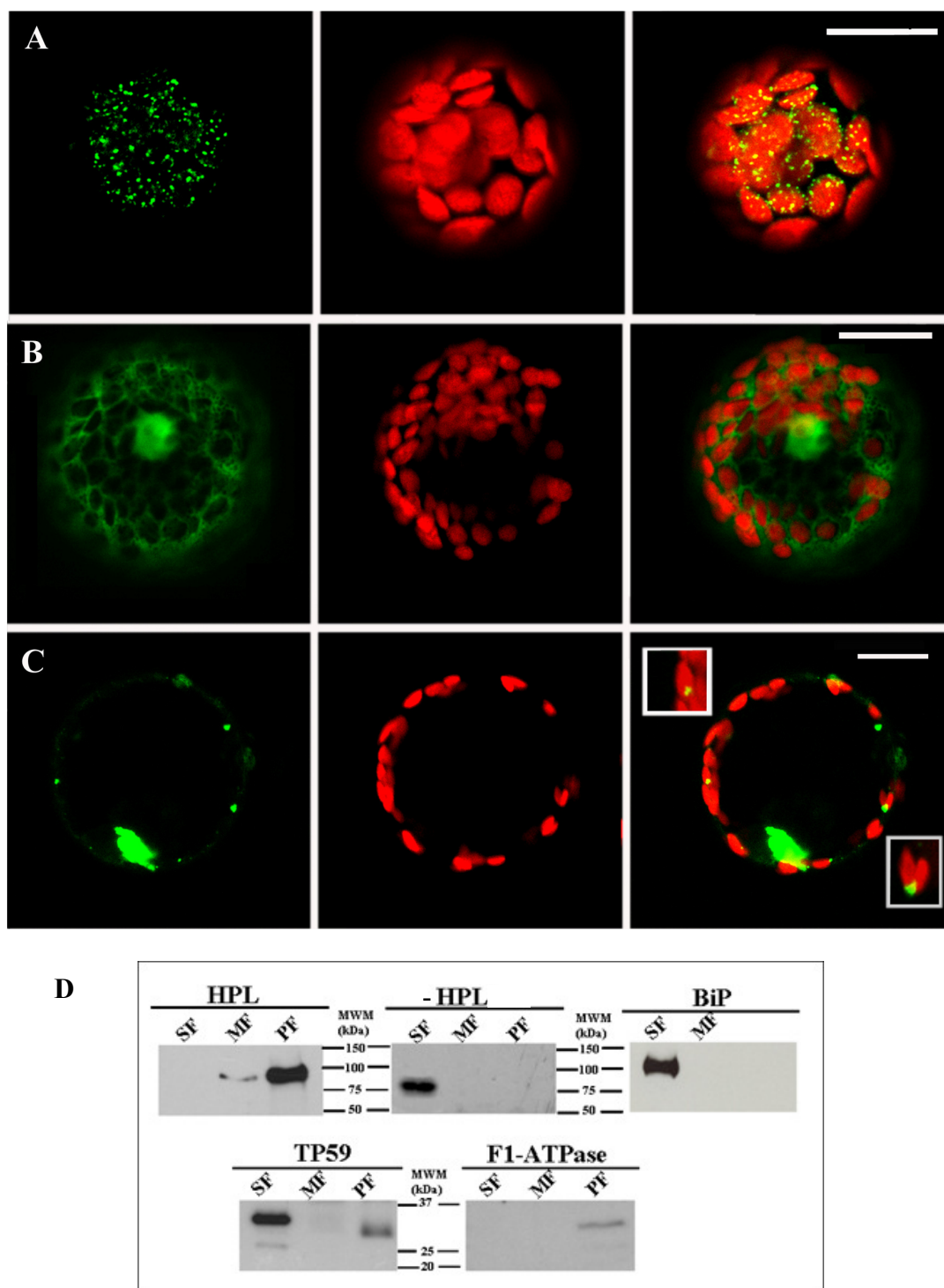


Figura 4.20 Espressione transiente in protoplasti di *N. tabacum* delle proteine chimeriche fluorescenti HPL-YFP (A), -HPL-GFP (B) e TP59-GFP (C). Nella prima colonna si osserva la fluorescenza dovuta alla GFP/YFP, nella seconda la fluorescenza dovuta a RFP, nella terza la sovrapposizione di GFP e RFP, e nell'ultima anche l'epifluorescenza della clorofilla. Scala: 20 μ m. (D) analisi *western blot* su frazioni solubile (SF), di membrana (MF) e plastidiali (PF) dei protoplasti trasformati utilizzando un anticorpo anti-GFP e gli anticorpi specifici per le proteine BiP e F1-ATPasi, marcatori del lumen del RE e dei plastidi rispettivamente, utilizzate come controlli positivi

A prova del passaggio del peptide di transito TP₅₉ attraverso il reticolo endoplasmico, un ulteriore esperimento di microscopia confocale è stato condotto su protoplasti di tabacco co-trasformati con la proteina ricombinante TP₅₉-GFP e con un marcatore del reticolo endoplasmico, RFP-KDEL. Da tali esperimenti è emersa una parziale ma diffusa co-localizzazione tra le due fluorescenze (Fig. 4.21B); tutto ciò fa quindi supporre un passaggio attraverso il reticolo endoplasmico, suggerendo in tal modo un *sorting* alternativo della proteina cloroplastidiale neo-sintetizzata via RE.

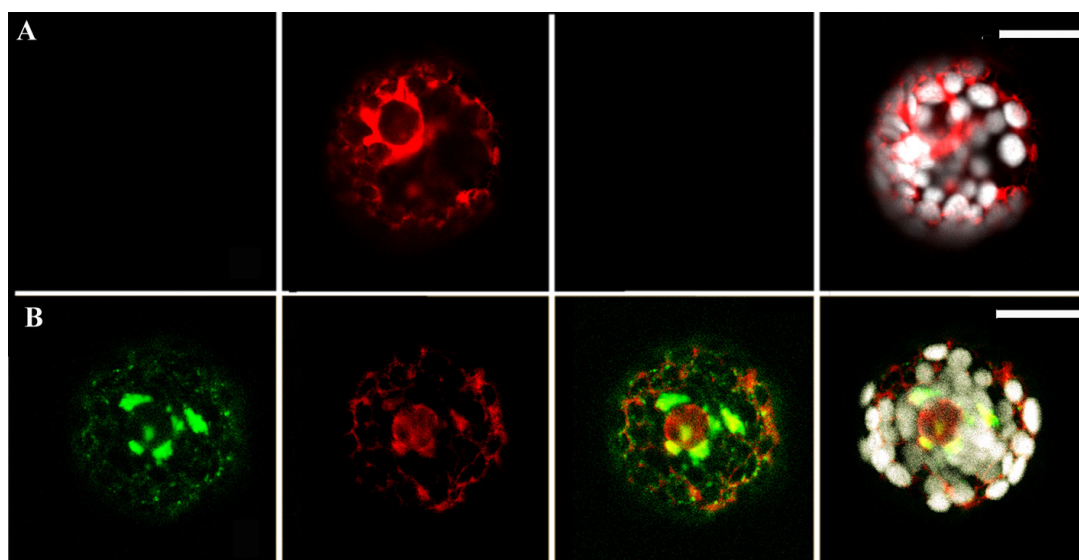


Figura 4.21 Protoplasti di tabacco in cui è espressa la proteina chimerica RFP-KDEL (**A**) ed in cui si osserva la co-localizzazione di RFP-KDEL con la proteina ricombinante TP₅₉-GFP (**B**). Nella prima colonna si osserva la fluorescenza dovuta alla GFP, nella seconda la fluorescenza dovuta a RFP, nella terza la sovrapposizione di GFP e RFP, e nell'ultima anche l'epifluorescenza della clorofilla. Scala: 20 μ m.

DISCUSSIONE

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stato studiato il ruolo delle ossilipine come molecole segnale nella risposta delle leguminose a stress di tipo abiotico, come la salinità del terreno e la siccità.

I meccanismi indotti nella pianta in risposta a questi due tipi di stress, tipici delle regioni Mediterranee, presentano infatti molte caratteristiche in comune dovute al fatto che entrambe le condizioni ambientali causano stress osmotico, soprattutto a livello radicale. E' in questo tessuto infatti che si ha una prima risposta nei confronti dello stress e che determina o meno un recupero di funzionalità a seguito di condizioni ambientali avverse.

I cambiamenti fenotipici o metabolici che si osservano sono dovuti a modificazioni nell'espressione genica. Di particolare interesse per il miglioramento di colture agronomiche risulta quindi il confronto tra il *pattern* di espressione genica di varietà che rispondono in maniera differente ad una determinata condizione ambientale.

E' stato preso spunto per questo da alcune analisi deepSuperSAGE condotte su piante di cece sottoposte a stress osmotico, indotto appunto da disidratazione o dalla presenza di sali nel substrato, che hanno permesso di identificare delle sonde specifiche per alcuni geni coinvolti nel metabolismo delle ossilipine.

L'analisi di espressione genica condotta nel presente lavoro indica chiaramente il coinvolgimento di tale via metabolica nelle prime fasi della risposta allo stress idrico. In particolare, dal confronto di due varietà differentemente adattate alla siccità, ICC 1882 (sensibile) e ICC 4958 (tollerante) (Varshney e coll., 2009), è emerso che la maggior parte dei geni presi in considerazione in questo studio presentano una forte regolazione positiva nel genotipo tollerante ICC 4958, soprattutto nelle prime fasi di siccità. La sola eccezione è rappresentata per il gene *aoc*, i cui livelli rimangono più o meno costanti, e α -*dox*, la cui espressione decresce in entrambe le varietà durante lo stress.

Globalmente, i dati indicano che in seguito all'induzione dello stress nel genotipo tollerante viene sovra-regolato sia il ramo della via metabolica relativo ad HPL (implicata nella biosintesi di aldeidi volatili) che quello relativo a AOS (strettamente correlata alla sintesi di acido jasmonico) (Fig. 1.4). Infatti i livelli di espressione dei geni *lox2*, *hpl1* and *hpl2*, *aos* and *opr* aumentano considerevolmente già alle 2 ore di carenza idrica.

L'induzione di geni implicati nel metabolismo dello ossilipine a seguito di stress abiotici è stato già riportato in precedenza (Molina e coll., 2011). Usando le stesse sonde utilizzate in questo lavoro di tesi, Molina e colleghi hanno infatti riportato un profilo di espressione simile nella varietà tollerante per l'isoforma *lox1* e per il gene *aoc* in esperimenti di qRT-PCR. Inoltre i livelli

di espressione di questi due geni presentavano una grossa variabilità tra le quattro varietà di cece testate. L'isoforma *lox1* per esempio, presenta un alto livello di espressione nel genotipo sale-sensibile Amdoun 1 ed in ICC 6098 (debolmente tollerante); mentre *aoc* è fortemente indotto in INRAT-93 (tollerante) già a due ore di induzione dello stress. Questi dati, insieme a quelli presentati nel presente lavoro (Fig. 4.13-4.14), confermano una rapida induzione nella biosintesi delle ossilipine in risposta alla carenza idrica e fanno supporre la presenza di una grossa variabilità nell'espressione di specifici geni tra varietà diverse di cece, facendo ipotizzare un diverso adattamento allo stress durante la storia evolutiva di tale specie.

A confermare questo profilo di espressione genica, l'analisi quantitativa delle principali ossilipine accumulate a livello radicale durante lo stress idrico ha evidenziato un forte induzione di acido jasmonico e jasmonoil-isoleucina nella varietà tollerante ICC 4958. Per quanto concerne la produzione di aldeidi volatili in risposta allo stress, i dati riportati in questo lavoro indicano una tardiva biosintesi di aldeidi a sei atomi di carbonio (esanale) a 48 ore dall'induzione dello stress in entrambe le varietà, con livelli più alti registrati nel genotipo sensibile ICC 1882 (Fig. 4.16). Tali risultati non correlano con i dati relativi all'espressione delle due isoforme di idroperossidi liasi, *hpl1* e *hpl2*, che presentano una sovra-regolazione già a partire dalle 2 ore di stress idrico nella varietà tollerante ICC 4958 (Fig. 4.13C-D). Questi risultati potrebbero indicare una scarsa disponibilità dei substrati per le isoforme di idroperossido liasi espresse nei tessuti radicali ed inoltre fanno supporre una differente distribuzione degli enzimi HPL e AOS, che competono per gli stessi substrati. E' da notare che nel genotipo tollerante ICC 4958 i livelli di HFA totali rimangono bassi sino le 24 ore, aumentando poi a seguito delle 48 ore di stress. La rapida attivazione del metabolismo dei jasmonati è confermato da un contemporaneo aumento dei livelli di OPDA (7 volte) JA (3 volte) e JA-Ile (30%) a 2 ore dall'induzione dello stress. Mentre OPDA e JA-Ile rimangono costanti o decrescono nel corso dello stress, i livelli di acido jasmonico (JA) presentano un picco di accumulo a 24 ore con una concentrazione di circa 6 nmoli per grammo di peso secco radicale, circa 10 volte superiore rispetto ai livelli riscontrati nel controllo. Il rapido aumento dei livelli di JA-Ile e OPDA, contemporanei all'induzione dei geni *aos* e *opr*, indicano che tali ossilipine potrebbero essere responsabili di una regolazione di tipo *feedback* positivo di alcuni geni chiave posti a monte della via di biosintesi dei jasmonati.

I risultati ottenuti suggeriscono che JA-Ile e OPDA potrebbero agire simultaneamente per promuovere un'efficiente attivazione di risposta alla siccità a livello radicale nella varietà tollerante ICC 4958 e precedere la sintesi di ABA (Fig. 4.12C e 4.17). Il *signaling* dell'acido abscissico in radice di cece potrebbe infatti essere regolato dagli alti livelli di OPDA e di jasmonati indotti dallo stress idrico. L'induzione nella sintesi di ABA da parte di jasmonati

volatili, quali il metil-jasmonato (MeJA), è già stata riportata. In *Oryza sativa* l'over-espressione dell'enzima JMT, coinvolto nella conversione di acido jasmonico in MeJA, porta ad un aumento dei livelli di ABA (Kim e coll., 2009). Gli Autori ipotizzano infatti che le piante di riso, in risposta alla siccità, incominciano a produrre MeJA, che a sua volta stimola la produzione di acido abscissico. Un recente lavoro, ipotizza ancora che l'incremento di ABA nello xilema è dovuto alla sua sintesi a livello fogliare e alla sua traslocazione alle radici (Goodger & Schachtman, 2010). Inoltre, altre molecole potrebbero avere un ruolo come primo segnale di stress. Se questo ruolo può essere svolto dai jasmonati, rimane ancora da essere dimostrato. L'aumento contemporaneo dei livelli di JA-Ile e OPDA a 2 ore dall'inizio dello stress in radici di ICC 4958, che precede la biosintesi di ABA, indica che i jasmonati potrebbero giocare un ruolo importante nelle prime fasi di risposta della pianta alla carenza idrica ed agire come mediatori nella biosintesi di acido abscissico. Tutte queste osservazioni supportano l'effetto sinergico di JA e ABA.

La stretta connessione tra gli ormoni vegetali ABA, JA, citochine ha un ruolo chiave nella crescita della pianta o nella senescenza durante stress abiotici (Schachtman & Goodger, 2008). Tuttavia, il contributo di ciascun elemento rimane controverso, poiché differenti risposte si evolvono tra diverse specie. I risultati qui riportati focalizzano l'importante ruolo dell'acido jasmonico nel primo segnale in radici di cece sottoposta a stress idrico ed il meccanismo di tolleranza di questa varietà.

Sono stati identificati diversi fattori di trascrizione che giocano un ruolo importante nell'induzione di *pathway* di segnale fitormonali (Furihata e coll., 2006; Chini e coll., 2007; Seki e coll., 2007; Thines e coll., 2007). Tra di essi MYC2, un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), è stato caratterizzato in *A. thaliana* come primo *target* del segnale mediato dai jasmonati. Una over-espressione di un membro MYC2 (*Os*bHLH 148) in piante di riso porta ad un aumento di tolleranza alla siccità (Seo e coll., 2011). MYC2 interagisce con alcuni membri della famiglia di proteine JAZ, per regolare l'espressione di geni indotti da jasmonati. Le proteine JAZ agiscono come repressori del segnale indotto da JA (Chini e coll., 2007; Thines e coll., 2007). Le forme attive di acido jasmonico, quali JA-Ile, possono legarsi al F-box di CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1), causando la degradazione delle proteine JAZ e quindi l'attivazione nell'espressione dei geni responsivi al JA. Per esempio, JAZ1/TIFY10A si lega ed inibisce MYC2 regolando positivamente la crescita delle radici laterali (Yadav e coll., 2005). La sua over-espressione causa una insensibilità all'acido jasmonico (Grunewald e coll., 2009), mentre in piante di *Arabidopsis* in cui JAZ1/TIFY10A non viene espressa si ha una forte

risposta al MeJA, con la riduzione nella crescita delle radici primarie ed un incremento nel numero di radici laterali. Alcune caratteristiche quali l'ampio e cespuglioso sistema radicale e la resistenza a *Fusarium oxysporum* (f. sp. *ciceri*) della varietà di cece ICC 4958 (ICRISAT, 1992), si accordano bene con i più alti livelli costitutivi di JA-Ile e la più rapida induzione di biosintesi di JA registrata a livello radicale. Ulteriori esperimenti sono tuttora in corso per verificare la risposta della parte aerea al *signaling* dell'acido jasmonico attivato da stress idrico, nelle due varietà di cece.

Per confermare ulteriormente i risultati ottenuti, abbiamo estrapolato dall'analisi microarray i valori di espressione dei principali geni a valle del *signaling* degli jasmonati. Da tale analisi è emerso che sia il fattore di trascrizione MYC2 che il repressore JAZ1/TIFY10A risultano over-espressi ad 1 e 10 ore dall'inizio dello stress salino (Fig. 5.1). E' da notare che anche il gene codificante il recettore COI1 delle forme attive dell'acido jasmonico, risulta leggermente sovra-espresso a 5 ore di stress salino. Tali risultati confermano la fine regolazione del *signaling* degli jasmonati mediata da meccanismi di *feedback* positivi e negativi e confermano l'importante ruolo di questi ormoni nella risposta precoce della pianta a stress abiotici. Ulteriori analisi di q-PCR sono in corso per confermare i risultati di espressione di tali geni.

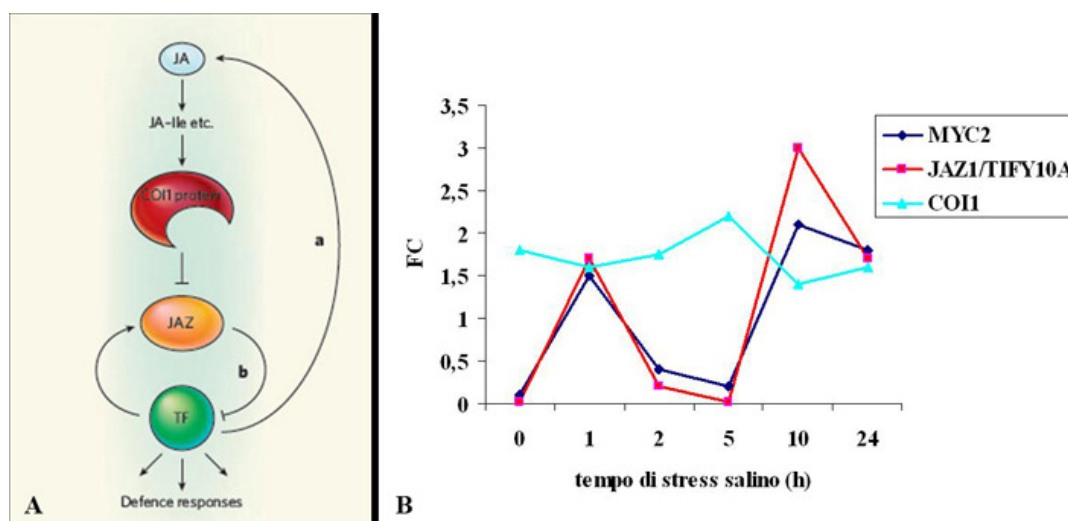


Figura 5.1 Sintesi di acido jasmonico (JA) controllata da un sistema a *feedback* positivo (a) e negativo (b) (A, Farmer, 2007). Dati estrapolati da analisi microarray, rappresentanti i livelli di espressione dei geni codificanti per MYC2, JAZ1/TIFY10A e COI1 a diversi tempi di stress salino, 0 (ctr), 2, 5, 10 e 24 ore, in radici di *M. truncatula* (Jemalong A17) (B). FC: *fold change*.

I risultati relativi alla rapida induzione di acido jasmonico nella risposta della radice allo stress idrico sono stati confermati dal lavoro di analisi chimica condotto su piantine di *M. truncatula* sottoposte a stress salino. Anche in questa leguminosa modello, sottoposta ad uno stress osmotico, si evidenzia un rapido accumulo a livello radicale di JA e JA-Ile, già ad un ora dall'inizio dello stress. E' interessante notare che nello stesso tessuto i livelli di ABA sono molto bassi. Nei tessuti aerei è stato invece riscontrato un leggero aumento di acido abscissico nelle foglie ad 1 ora di stress, tale livello si mantiene costante sino le 48 ore; mentre nel fusto la quantità di ormone rimane costante fino a 6 ore di stress, per poi aumentare a 24 e 48 ore. Per quanto riguarda l'acido salicilico, i suoi livelli nella radice raddoppiano a 1 ora in dipendenza dal picco di JA e JA-Ile e si mantengono costanti sino alle 24 ore per poi aumentare nuovamente alle 48 ore.

Da questi risultati è possibile concludere che alcune ossilipine appartenenti alla famiglia dei jasmonati sono coinvolte nella prima fase della risposta della radice allo stress osmotico (salino ed idrico). Tuttavia i bassi livelli di tali molecole riscontrati nel fusto a 1, 2 e 6 ore sembrano suggerire la presenza di altre molecole coinvolte nella traduzione del segnale di stress verso la parte aerea della pianta. Tra le molecole potenzialmente coinvolte nel *signaling* distale dello stress abiotico vi possono essere altre ossilipine non comprese in questo studio come il MeJA ed altri segnali come H₂O₂, SA (Clarke e coll., 2009), di tipo chimico (solfati, Goodger & Schachtman, 2010) o di tipo fisico (cambiamenti di potenziale, pH; Schachtman & Goodger, 2008).

E' noto ad esempio che insieme all'ABA, considerato l'ormone principale nell'induzione della chiusura degli stomi in seguito a stress idrico, anche il MeJA ha un effetto analogo come evidenziato in diverse specie vegetali quali *A. thaliana* (Munemasa e coll., 2007), *Hordeum vulgare* (Tsonev e coll., 1998) e *Vicia faba* (Liu e coll., 2002). In riso il MeJA stimola la produzione di ABA (Kim e coll., 2009). Piantine di riso che sovra-esprimono il gene codificante per la metiltrasferasi (JMT) che converte il JA in MeJA, presentavano alti livelli di questa ossilipina. Tali piante inoltre presentano un ridotto numero di spighe ed in condizioni di stress abiotico la produzione di ABA aumenta di 1,9 volte. Tale ipotesi è supportata dall'osservazione che il trattamento con il MeJA induce la sintesi di ABA in frutti di ciliegio (Kondo e coll., 2002). Inoltre il gene SDR (*Short chain Dehydrogenase Reductase*), essenziale per la biosintesi di ABA, è over-espresso nelle piante di riso che over-esprimono l'enzima JMT. Ulteriori analisi sono necessarie per monitorare i livelli di MeJA nelle piante di *M. truncatula*.

Da un punto di vista molecolare, inizialmente sono stati confermati i dati estrapolati da un lavoro basato su analisi microarray e condotto su piantine di Jemalong A17 sottoposte e non stress

salino (Gruber e coll., 2009). Il confronto dell'espressione genica a livello radicale metteva in evidenza infatti la sovra-regolazione, a seguito di brevi periodi di stress (1 ora), di quattro geni chiave del metabolismo delle ossilipine: *lox*, *hpl*, *aos* e *aoc*. I risultati ottenuti, confermando i dati microarray, riportano una espressione dei geni *lox* e *aoc* di circa 8 volte superiori.

Analisi di silenziamento in radici di *M. truncatula* hanno quindi permesso di valutare se l'assenza di uno di questi quattro geni potesse influenzare la crescita della pianta, sia in condizioni controllo che in presenza di sale. In condizioni di stress salino, radici di piante in cui i geni *aos* e *aoc* sono silenziati presentano un allungamento radicale maggiore delle piante *gus*-RNAi e paragonabile alle piante cresciute in assenza di sale. In queste radici inoltre, analisi chimiche hanno confermato un minore accumulo di OPDA, il precursore dell'acido jasmonico, prodotto dalla azione a cascata degli enzimi AOS e AOC. Ulteriori indagini sono tuttora in corso per definire i livelli di accumulo delle altre ossilipine prodotte a valle nella via metabolica. Tuttavia questi dati preliminari fanno supporre una bassa concentrazione di acido jasmonico. E' già stato osservato infatti che radici di *M. truncatula* in cui è stato espresso un cDNA antisense di *MtAOC1* presentano bassi livelli di JA ed un ritardo nei processi di colonizzazione da parte di funghi patogeni (Isayenkov e coll., 2005). Mutanti negativi per *aos* di *A. thaliana* sono sterili e difettivi nel segnale di risposta a ferita, condizioni poi ristabilite da somministrazioni esogene di JA (Park e coll., 2002). Inoltre, la biosintesi di acido jasmonico indotta da stress da ferita, arresta la crescita di piante di *Arabidopsis* inibendo la mitosi in giovani foglie e meristemi attraverso un meccanismo che coinvolge COI1, JAZ e MYC2 (Zhang & Turner, 2008). Questo "effetto bonsai" dovuto all'azione di JA, potrebbe perciò venir meno in radici di *M. truncatula* in cui l'espressione degli enzimi AOS o AOC è stata sotto-regolata in seguito a silenziamento genico.

In ultimo, la rapida attivazione del metabolismo delle ossilipine durante le prime fasi di risposta della pianta allo stress indica che i principali enzimi della via metabolica sono già presenti in cellula e lo studio della loro localizzazione risulta particolarmente importante per verificare la disponibilità dei substrati per l'attività catalitica dei vari enzimi operanti nel *pathway* metabolico delle ossilipine.

Il frazionamento sub-cellulare di foglie di *M. truncatula* e la successiva analisi *western* ha permesso di determinare una localizzazione tilacoidale per *MtAOS* e *MtAOC* e stromatica per *MtLOX*, risultato questo non apprezzabile in figura 4.18, in quanto il protocollo utilizzato per ottenere le diverse frazioni sub-plastidiali porta ad un'eccessiva diluizione della componente stromatica e quindi ad una bassa efficienza di rilevazione per proteine poco rappresentate in questa frazione. Diversi lavori riportano una localizzazione lamellare per la allene ossido sintasi,

stromatica per LOX, mentre una distribuzione sia stromatica che tilacoidale è stata osservata per l'enzima AOC (Farmaki e coll., 2007) che sembra essere mobile all'interno del cloroplasto.

Uno *pattern* di localizzazione insolito è stato invece osservato per l'idroperossido liasi che non sembra avere una localizzazione plastidiale, nonostante la presenza di un putativo peptide di transito per il cloroplasto di circa 59 aminoacidi. Analisi di microscopia confocale utilizzando costrutti chimerici derivati dalla fusione del TP₅₉ e della restante parte della proteina con un *tag* fluorescente (GFP) hanno permesso di ipotizzare la presenza di altri segnali oltre un *sorting* diverso della proteina ai plastidi. La proteina quindi potrebbe associarsi alla membrana esterna dei cloroplasti ed essere trasportata all'interno in un secondo momento, a seguito di induzione del segnale di stress.

CONCLUSIONI

6. CONCLUSIONI

- L'analisi di espressione genica condotta sulle due varietà di *Cicer arietinum* differentemente adattate alla carenza idrica, indica chiaramente il coinvolgimento della via metabolica delle ossilipine nelle prime fasi della risposta alla siccità.
- Nel genotipo tollerante viene sovra-regolato sia il ramo della via metabolica relativo ad HPL (implicata nella biosintesi di aldeidi volatili) che quello relativo a AOS (strettamente correlata alla sintesi di acido jasmonico). L'analisi quantitativa delle ossilipine hanno evidenziato un forte induzione di acido jasmonico e jasmonoil-isoleucina (la sua forma attiva) a livello radicale nella varietà tollerante, durante lo stress idrico.
- La tardiva biosintesi di aldeidi in entrambe le varietà, con livelli più alti registrati nel genotipo sensibile, potrebbe indicare una scarsa disponibilità di substrato per le due isoforme di idroperossidi liasi, che sono comunque sovra-esprese nei tessuti radicali già a due ore dall'inizio dello stress nella varietà tollerante. Tutto ciò fa supporre una competizione metabolica tra gli enzimi HPL e AOS, che competono per gli stessi substrati.
- Frazionamenti sub-cellulari di foglie di *M. truncatula* hanno permesso di determinare una localizzazione tilacoidale per MtAOS e MtAOC, stromatica per MtLOX ed un *pattern* di localizzazione insolito per MtHPL, che non sembra avere una localizzazione plastidiale nonostante la presenza di un putativo peptide di transito per il cloroplasto. Analisi di microscopia confocale hanno permesso di ipotizzare la presenza di altri segnali all'interno della sequenza aminoacidica dell'enzima ed importanti per il suo *sorting*. L'HPL di *M. truncatula* potrebbe essere associata alla membrana esterna dei plastidi ed essere traslocata all'interno in un secondo momento, a seguito di specifici segnali di stress.
- Una rapida induzione di acido jasmonico e jasmonil-isoleucina a livello radicale è anche stata riscontrata in piantine di *M. truncatula*, sottoposte a stress salino. I bassi livelli di ABA riscontrati in questo tessuto ed i livelli più elevati riscontrati in foglie e fusto, dove si assiste ad un incremento nel tempo dell'ormone, suggeriscono inoltre un ruolo per i jasmonati come molecole segnale coinvolte nell'induzione della sintesi di ABA, principale ormone responsabile della regolazione stomale.

- In ultimo, la soppressione nell'espressione di enzimi come allene ossido sintasi e allene ossido ciclasasi in radice potrebbe portare ad minore accumulo di jasmonati a tale livello e alla riduzione dell'“effetto bonsai”, una risposta già descritta in molte piante in seguito a stress abiotici. L'insieme dei risultati ottenuti durante l'attività del dottorato di ricerca fa ipotizzare un ruolo molto importante degli jasmonati nella risposta di difesa della pianta a stress abiotici.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Aceves NE, Stolzy LH, Mehuys GR (1975). Effect of soil osmotic potential produced with two salt species on plant water potential, growth and grain yield of wheat. *Plant Soil* 42: 619–627.

Adie BAT, Pe´rez-Pe´rez J, Pe´rez-Pe´rez MM, Godoy M., Sa´nchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 1665–1681.

Albrechtova´ JPT, Ullmann J (1994). Methyl jasmonate inhibits growth and flowering in *Chenopodium rubrum*. *Plant Biology* 36: 317–319.

Anderson JM. (1989). Membrane-derived fatty acids as precursor to second messengers. In *Second messengers in plant growth development* WF Smith, DJ Morr. Eds. Vol. 6 Alan R Eds. Vol 6. Alan R Liss, New York, 181-212.

Arimura G, Ozawa R, Horiuchi J, Nishioka T, Takabayashi J (2001). Plant--plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics Ecology* 29: 1049–1061.

Bate NJ, Rothstein SJ (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal* 16: 561–569.

Bernstein L (1964). Salt tolerance of plants. *USDA Agriculture Information Bulletin* 283. p. 23. Department of. Washington, DC.

Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF (1981). A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS letters* 134(2): 231-234.

Block A, Schmelz E, Jones JB, Klee HJ (2005). Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Molecular Plant Pathology* 6: 79–83.

Blondon F (1964). Contribution a` l'e´tude du de´veloppement de gramine´es fourrage`res: ray-grass et dactyle. *Revue G´en´erale de Botanique* 71: 293–381.

Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcı´a F, Becard G, Rosenberg C, Barker DG (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 695-700.

Brini F, Gaxiola R, Berkowitz G, Masmoudi K (2005). Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 347-354.

Brini F, Hanin M, Mezghanni I, Berkowitz G, Masmoudi K (2007a). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHX1* and H⁺-pyrophosphatase *TVPI* improve salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 58: 301-308.

Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pagès M, Masmoudi K (2007b). Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 26: 2017-2026.

- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R (2006). Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 142(1): 28-39.
- Chang RZ, Chen YW, Shao GH, Wan CW (1994). Effect of salt stress on agronomic characters and chemical quality of seeds in soybean. *Soybean Science* 13: 101–105.
- Chehab EW, Raman G, Walley JW, Perea JV, Banu G, Theg S, Dehesh K (2006). Rice HYDROPEROXIDE LYASES with unique expression patterns generate distinct aldehyde signatures in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141(1):121-134.
- Chen H, McCaig BC, Melotto M, He SY, Howe G A (2004). Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *The Journal of Biological Chemistry* 279(44): 45998-6007.
- Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of National Academy of Science USA* 102(52): 19237-19242.
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666–671.
- Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJM, Wasternack C, Mur LAJ (2009). Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 182(1): 175-187.
- Cortina C, Culianez-Macia FA (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169: 75-82.
- Creelman RA, Mullet JE (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of National Academy of Science USA* 92: 4114–4119.
- Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W (2005). Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 285-295.
- De Domenico S, Tsesmetzis N, Di Sansebastiano GP, Hughes RK, Casey R, Santino A (2007). Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes. *BMC Plant Biology* 7:58.
- de Lorenzo L, Merchan F, Blanchet S, Megias M, Frugier F, Crespi M, Sousa C (2007). Differential expression of the TFIIIA regulatory pathway in response to salt stress between *Medicago truncatula* genotypes. *Plant Physiology* 145: 1521-1532.
- De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel non-specific females. *Nature* 410: 577–580.

- Ellinger D, Stingl N, Kubigsteltig II, Bals T, Juenger M, Pollmann S, Berger S, Schuenemann D, Mueller MJ (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiology* 153(1): 114-127.
- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 1781-1785.
- Farag MA, Pare PV (2002). C6-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* 61: 545-546.
- Farmaki T, Sanmartín M, Jiménez P, Paneque M, Sanz C, Vancanneyt G, León J Sánchez Serrano JJ (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 58: 555-568.
- Farmer EE (2007). Jasmonate perception machines. *Plant Biology* 448: 659-660.
- Feussner I, Wasternack C (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53: 275-297.
- Fliegmann J, Schuler G, Boland W, Ebel J, Mithofer A (2003). The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. *Biological Chemistry* 384: 437-446.
- Flors V, Ton J, van Doorn R, Jakab G, García-Agustín P, Mauch-Mani B (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 54: 81-92.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344-350.
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* 125: 306-317.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006). Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *PNAS* 103(6): 1988-1993.
- Gao X, Starr J, Göbel C, Engelberth J, Feussner I, Tumlinson J, Kolomiets M (2008) Maize 9-lipoxygenase *ZmLOX3* controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 21(1):98-109.
- Gardner HW, Dornbos DLJ, Desjardins A (1990). Hexanal, trans-2-hexenal, and trans-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 38: 1316-1320.
- Georgin P, Gouet M (2000). Statistiques avec Excell. Eyrolles, Paris, p 338.

- Gidda SK, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C, Varin L (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(20):17895-17900.
- Goodger JQD, Schachtman DP (2010). Re-examining the role of ABA as the primary long-distance signal produced by water-stressed roots. *Plant Signaling & Behavior* 5(10): 1298-1301.
- Grechkin AN, Ilyasov AV, Hamberg M (1997). On the mechanism of biosynthesis of divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic bulbs. *Biochemical Journal* 245:137-142.
- Greenway H, Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 149-190.
- Gruber V, Blanchet S, Diet A, Zahaf O, Boualem A, Kakar K, Alunni B, Udvardi M, Frugier F, Crespi M (2009). Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in *Medicago truncatula*. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 55-66.
- Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inze D, Gheysen G, Goossens A (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *Embo reports* 10(8): 923-928.
- Hasegawa PM., Bressan RA, Zhu JK Bohnert H.J (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* 24: 113-126.
- Heil M, Ton J (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* 13: 264-272.
- Hildebrand D, Fukushige H, Afithile M, Wang C (1998). Lipoxygenases in plant development and senescence. In *Eicosanoids and related compounds in plant and animals*. Edited by Rowley, Kuhn, Schewe, Princeton: Princeton university press, 151-181.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva ET, Welin B (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51: 177-185.
- Howe GA, Schilmiller AL (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 230-236.
- Hughes RK, Wu Z, Robinson DS, Hardy D, West SI, Fairhurst SA, Casey R (1998) Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms. *Biochemical Journal* 333: 33-43.
- Hughes RK, De Domenico S, Santino A (2009). Plant cytochromes CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *Chembiochem* 10: 1122-1133.

ICRISAT (*International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics* Patancheru, Andhra Pradesh 502 324, India) (1992). ICC 4958. A Drought Resistant. *Chickpea Plant Material Description* no. 33.

Isayenkov S, Mrosk C, Stenze I, Strack D, Hause B (2005). Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* 139: 1401–1410.

Jain D, Chattopadhyay D (2010). Analysis of gene expression in response to water deficit of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties differing in drought tolerance. *BMC Plant Biology* 10:24.

Kang JH, Wang L, Giri A, Baldwin IT (2006). Silencing threonine deaminase and *JAR4* in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid–isoleucine–mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell* 18: 3303–3320.

Katsir L, Chung HS, Koo AJK, Howe GA (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing *Current Opinion in Plant Biology* 11(4): 428–435.

Kim EH, Kim YS, Park SH, Koo YJ, Choi YD, Chung YY, Lee IJ, Kim JK (2009). Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant Physiology* 149: 1751–1760.

Kiribuchi K, Jikumaru Y, Kaku H, Minami E, Hasegawa M, Kodama O, Seto H, Okada K, Nojiri H, Yamane H (2005). Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 69: 1042–1044.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J (2005) Volatile C6-aldehydes and Alloocimene activate defence genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46: 1093–1102.

Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J, Boland W (1999). Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid signaling pathway. *Plant Physiology* 121: 153–162.

Kondo S, Motoyama M, Michiyama H, Kim M (2002). Roles of jasmonic acid in the development of sweet cherries as measured from fruit or disc samples. *Plant Growth Regulation* 37: 37–44.

Koo AJK, Gao X, Jones AD, Howe GA (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59(6): 974–986.

Koo AJK, Howe GA (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70(13–14): 1571–1580.

Kourtchenko O, Andersson MX, Hamberg M, Brunnström A, Göbel C, McPhail KL, Gerwick WH, Feussner I, Ellerström M (2007). Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in *Arabidopsis*: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiology* 145(4): 1658–1669.

- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(6): 2940-2945.
- Landy A (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* 58: 913-949.
- Leo'n J, Royo J, Vancanneyt G, Sanz C, Silkowski H, Griffiths G, Sa'nchez-Serrano JJ (2002). Lipoxxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. *Journal of Biological Chemistry* 277: 416-423.
- Levitt J (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. I *Chilling, freezing, and high temperature stress* (London, New York, toronto: Academic Press).
- Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Javanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* 17(3): 971-986.
- Li WYF, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM (2006). Tonoplast-located *GmCLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell & Environment* 29: 1122-1137.
- Liavonchanka A, Feussner I (2006). Lipoxxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163(3):348-357.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. F4.3.1-F4.3.8.
- Liu X, Zhang SQ, Lou CH, Yu FY, (2002). Effect of localized scorch on the transport and distribution of exogenous jasmonico acid in *Vicia faba*. *Acta botanica Sinica* 44: 164-167.
- Mahajan S, Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stress: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Malone M, Alarcon JJ (1995). Only xylem-borne factors can account for systemic wound signalling in the tomato plant. *Planta* 196: 740-746.
- Manchanda G, Garg N (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:595-618.
- Marchan F, de Lorenzo L, Gonzalez Rizzo S, Niebel A, Manyani H, Frugier F, Sousa C, Crespi M (2007). Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 51:1-17.
- Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD (2005). The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* 436: 866-870.
- Matsui K, Shibutani M, Hase T, Kajiwara T (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrom P450 (CYP74B). *FEBS Letters* 394: 21-24.

- Matsui K, Kurishita A, Hisamitsui A, Kajiwaru T (2006). A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. *Biochemical Society Transaction* 28: 857-860.
- Mei C, Qi M, Sheng G, Yang Y (2006). Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19: 1127–1137.
- Mita G, Gallo A, Greco V, Zasiura C, Casey R, Zacheo G, Santino A (2001). Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus dulcis*) seed. *European Journal of Biochemistry* 268(5):1500-1507.
- Mita G, Quarta A, Fasano P, De Paolis A, Di Sansebastiano GP, Perrotta C, Iannacone R, Belfield E, Hughes R, Tsesmetzis N, Casey R, Santino A (2005). Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies. *Journal of Experimental Botany* 56(419):2321-2333.
- Mita G, Fasano P, De Domenico S, Perrone G, Epifani F, Iannacone R, Casey R, Santino A (2007). 9-Lipoxygenase metabolism is involved in the almond/*Aspergillus carbonarius* interaction. *Journal of Experimental Botany* 58: 1803-1811.
- Molina C, Rotter B, Horres R, Udupa SU, Besser B, Bellarmino L, Baum M, Matsumura H, Terauchi R, Kahl G, Winter P (2008). SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics* 9:553.
- Molina C, Allah MZ, Khan F, Fatnassi N, Horres R, Rotter R, Steinhauer D, Amenc L, Drevon JJ, Winter P, Kahl G (2011). The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. *BMC Plant Biology* 11:31.
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Montagu MV (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9: 2243–2259.
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(6):511-517.
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2007). The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiology* 143: 1398–1407.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress *Plant, Cell and Environment* 25: 239–250
- Noordermeer MA, Veldink GA, Johannes F, Vliegthart G (2001a). Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology* 2: 494-504.
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JFG (2001b). Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Letters*, 489: 229-232.

- Nojavan-Asghari M, Ishizawa K (1998). Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Journal of Plant Growth Regulation* 17(1): 13-18.
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA, Feyereisen R (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 31(1):1-12.
- Park YS, Kunze S, Ni X, Feussner I, Kolomiets MV (2010). Comparative molecular and biochemical characterization of segmentally duplicated 9-lipoxygenase genes *ZmLOX4* and *ZmLOX5* of maize. *Planta* 231(6):1425-1437.
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramírez I, Pen˜ a-Corte's H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* 41: 149–158.
- Pedranzani H, Sierra-de-Grado R, Vigliocco A, Miersch O, Abdala G (2007). Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulation* 52: 111–116.
- Phang TH, Shao G, Lam HM (2008). Salt tolerance in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (10): 1196–1212.
- Poltronieri P, Bonsegna S, De Domenico S, Santino A (2011). Molecular Mechanisms in Plant Abiotic Stress Response. *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.* 48: 627-634.
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé MT, Rosah S, Castresana C, Hamberg M, Fournie RJ (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defence against pathogens *Plant Physiology* 139: 1902-1913.
- Psylinakis E, Davoras EM, Ioannidis N, Trikeriotis M, Petrouleas V, Ghanotakis DF (2001). Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase. *Biochiica et Biophysica Acta* 1533: 119-127.
- Ptashne M (1992). A genetic switch: phage (Lambda) and higher organisms. *Cambridge, MA: Cell Press*.
- Quandt HJ, Pühler A, Broer I (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 699-706.
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashi H (2002). Octadecanoid signaling component “burst” in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 1041–1045.
- Saniewski M, Miyamoto K, Ueda J (1998). Methyl jasmonate induces gums and stimulates anthocyanin accumulation in peach shoots. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 121–124.

- Santino A, De Polis A, Gallo A, Quarta A, Casey R, Mita G (2003) Biochemical and molecular characterization of hazelnut (*Corylus avellana*) seed lipoxygenases. *European Journal of Biochemistry* 270, 4365–4375.
- Santino A, Bonseghna S, De Domenico S, Poltronieri P (2011). Plant oxylipins and their contribution to plant defence. *Current Topics in Plant Biology* 11: 103-111.
- Schachtman DP, Goodger JQ (2008). Chemical root to shoot signalling under drought. *Trends in Plant Science* 13(6):281-287.
- Schaller F, Schaller A, Stintzi A (2005). Biosynthesis and Metabolism of Jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 179-199.
- Schaller A, Stintzi A (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70(13-14):1532-1538.
- Schewe T (1998). Basic functions of lipoxygenases and their products in higher plants. In *Eicosanoids and related compounds in plant and animals*. Edited by Rowley, Kuhn, Schewe, Princeton: Princeton university press, 133-150.
- Schilmiller AL, Howe GA (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4):369-377.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant response. *Proceedings of National Academy of Science USA* 98: 4788–4793.
- Seo YS, Chern M, Bartley LE, Han M, Jung KH, Lee I, Walia H, Richter T, Xu X, Cao P, Bai W, Ramanan R, Amonpant F, Arul L, Canlas PE, Ruan R, Park CJ, Chen X, Hwang S, Jeon JS, Ronald PC (2011). Towards establishment of a rice stress response interactome. *Plos Genetics* 7(4): 1-12.
- Sharma SK, Gupta IC (1986). Saline environment and plant growth. *Agro Botanical Publishers* (India)
- Sharma KK, Lavanya M (2002). Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. In. M. Ivanaga (ed.) *Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress*. JIRCAS Working Report No. 23: 61-73; JIRCAS: Tsukuba , Japan.
- Sheoran IS, Garg OP (1983). Effect of different types of salinity on gram (*Cicer arietinum* L.) during germination. I. Seedling growth and water relations. *India Journal of Plant Physiology* 26: 363-369.
- Staswick PE, Su W, Howell SH (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of National Academy of Science USA* 89: 6837–6840.

Staswick PE, Tiryaki I (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(8):2117-2127.

Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE (2001). Plant defence in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 98(22):12837-12842.

Strogonov BP, Kabanov VV, Shevjakova NI, Lapina LP, Komizerko EI, Popov BA, Dastanova RKh, Prykhod'ko LS (1970). Structure and function of plant cell under salinity. Moscow, Nauka, Russia.

Sun YX, Wang D, Bai YL, Wang NN, Wang Y (2006). Studies on the overexpression of the soybean *GmNHX1* in *Lotus corniculatus*: the reduced Na⁺ level is the basis of the increased salt tolerance. *Chinese Science Bulletin* 51: 1306–1315.

Tani T, Sobajima H, Okada K, Chujo T, Arimura S, Tsutsumi N, Nishimura M, Seto H, Nojiri H, Yamane H (2008). Identification of the *OsOPR7* gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* 227: 517–526.

Theodolou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* 137:835-840.

Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–665.

Thorpe MR, Ferrieri AP, Herth MM, Ferrieri RA (2007). ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* 226(2): 541-551.

Timperio AM, Huber CG, Zolla L. (2004). Separation and identification of the light harvesting proteins contained in grana and stroma thylakoid membrane fractions. *Journal of Chromatography A* 1040: 73-81.

Tijet N, Schneider C, Muller BL, Brash AR (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 386(2): 281-289.

Truchet G, De'ebelle F, Vasse J, Terzaghi B, Garnerone AM, Rosenberg C, Batut J, Maillet F, De'narie' J (1985). Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *Journal of Bacteriology* 164: 1200–1210.

Tsonev TD, Lazova GN, Stoinova ZG, Popova LP (1998). A possible role for Jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of plant growth regulation* 17:153-159.

- Ueda J, Kato J (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* 66: 246–249.
- Ueda J, Kato J (1982). Inhibition of cytokinin-induced plant growth by jasmonic acid and its methyl ester. *Plant Physiology* 54: 249–252.
- Varshney RK, Hiremath PJ, Lekha P, Kashiwagi J, Balaji J, Deokar AA, Vadez V, Xiao Y, Srinivasan R, Gaur PM, Siddique KHM, Town CD, Hoisington DA (2009). A comprehensive resource of drought- and salinityresponsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics* 10: 523.
- Vellosillo T, Martinez M, Lopez MA, Vicente J, Cascon T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C (2007). Oxylipins produced by the 9-Lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defence response through a specific signalling cascade. *Plant Cell* 19: 831–846.
- Vick BA (1993). Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In *Lipid Metabolism in Plants*. Moore, T.S.J., Ed.; CRC: Boca Raton FL, 167–191.
- Vinocur B, Altman A (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123–132.
- Wan C, Shao G, Chen Y, Yan S (2002). Relationship between salt tolerance and chemical quality of soybean under salt stress. *Chinese Journal of Oil Crop Science* 24: 67–72.
- Wang JW, Czech B, Weigel D (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738–749.
- Wang Y, Mopper S, Hasenstein KH (2001) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology* 27: 327–342.
- Wasternack C, Parthier B (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Science* 2: 302–307.
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O (2006). The wound response in tomato--role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* 163(3): 297–306.
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100(4):681–697.
- Wasternack C, Kombrink E (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* 5(1): 63–77.
- Weisberg R, Landy A (1983). Site-specific recombination in phage lambda. In *Lambda II* R. Hendrix, J. Roberts, F. Stahl, and R. Wetsberg, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 221–250.
- Whitmore AP, Whalley WR (2009). Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany* 60: 2845–2857.

- Wilkinson S, Davies WJ (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of response to stress in plants. *Plant, Cell Environment* 25: 195-210.
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005). A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* 17:1953-1966.
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X (2007). AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. *The Journal of Biological Chemistry* 282(25): 18116-18128.
- Zeringue HJ (1991). Effect of C6 to C9 alkenals on aflatoxin production in corn, cottonseed, and peanuts. *Applied. Environmental Microbiology* 57: 2433–2434.
- Zhang ZP, Baldwin IT (1997). Transport of (2-14C)jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 203 (4): 436-441.
- Zhang Y, Turner JG (2008). Wound-induced endogenous JAs stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS One* 3: e3699.
- Zimmerman DC, Coudron CA (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12 oxo-trans-10-dodecenoic acid. *Plant Physiology* 63: 536-541.

COLLABORAZIONI E RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro di Dottorato di Ricerca è stato condotto in collaborazione con:

- Prof. Rod Casey ed il Dott. Richard Hughe del *John Innes Centre* (Norwich, GB).
- Prof. Gunther Kahl dell' università di Francoforte ed il Dott. Peter Winter della GeneXPro, Francoforte (Germania).
- Prof. Martin Crespi e la Prof.ssa Veronique Gruber del *CNRS* (Gif sur Yvette, Francia).
- Dott. Victor Flors dell' università di Castellón (Spagna).

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni attinenti alla tematica oggetto della tesi

- Poltronieri P, Bonsegna S, **De Domenico S**, Santino A. (2011). Molecular Mechanisms in Plant Abiotic Stress Response. *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.* 48: 627-634.
- Santino A, Bonsegna S, **De Domenico S**, Poltronieri P (2011) Plant oxylipins and their contribution to plant defence. *Current Topics Plant Biology* (11): 103-111.
- Hughes RK, **De Domenico S**, Santino A. (2009). Plant Cytochromes CYP74: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *Chembiochem.* 10(7): 1122-1133.

Pubblicazioni su altre tematiche di ricerca

- Vergara D, Simeone P, Toraldo D, Del Boccio P, Vergaro V, Leporatti S, Pieragostino D, Tinelli A, **De Domenico S**, Alberti S, Urbani A, Salzet M, Santino A, Maffia M. (2012) Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Mol Biosyst.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print].
- **De Domenico S**, Bonsegna S, Lenucci MS, Poltronieri P, Di Sansebastiano GP, Santino A. (2011) Localisation of Seed Oil Body Proteins in Tobacco Protoplasts Reveals Specific Mechanisms of Protein Targeting to Leaf Lipid Droplets. *Journal of Integrative Plant Biology.* 53(11):858-868.
- Ingrosso I, Bonsegna S, **De Domenico S**, Laddomada B, Blando F, Santino A, Giovinazzo G. (2011). Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarpy and causes abnormal pollen development. *Plant Physiol Biochem.* 49(10):1092-9.

Partecipazione a congressi nazionali ed internazionali

- Vergara D, Toraldo D, del Boccio P, Pieragostino D, Simeone P, Tinelli A, **De Domenico S**, Acierno R, Giovinazzo G, Urbani A, Santino A, Maffia M. Phytochemicals resveratrol and curcumin as potential agents in the prevention and therapy of ovarian and breast cancers. 6th Annual national Conference. 21-24 giugno 2011 Torino (Italia).
- Comunicazione orale: **De Domenico S**, Ingrosso I, Bonsegna S, D'Amico L, Blando F, Laddomada B, Santino A, Giovinazzo G. Biothenological production of resveratrol in tomato plants: effects on the nutritional value of fruits and seed sets. SOCIETA' BOTANICA ITALIANA Riunione Annuale dei Gruppi di Lavoro di: "Biologia Cellulare e Molecolare" e "Biotecnologie e Differenziamento" 16-18 Giugno 2010 Lecce (Italia).
- Gallo A, Bonsegna S, **De Domenico S**, Epifani F, Perrone G, Santino A. The lipid metabolism has a central role in the healthy properties of nuts and in the communication with fungal pathogens. 3th International congress on food and nutrition, 22-25 aprile 2009 Antalya (Turchia).

