



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XVIII CICLO.

La sovraespressione della PGIP in piante transgeniche di frumento
determina un incremento di resistenza contro i patogeni fungini

BIO04

Coordinatore: Prof. Domenico Lafiandra

Firma

Tutor: Prof. Renato D'Ovidio

Firma.....

Dottoranda: Michela Janni

Firma

INDICE

RIASSUNTO	vii
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 . Il frumento.....	3
1.2 Stadi fenologici del frumento:la scala Zadoks	4
1.3 Interazione pianta-patogeno	7
1.3.1 Le basi genetiche dell'interazione pianta-patogeno	8
1.4 Meccanismi di difesa della pianta	9
1.4.1 Meccanismi di difesa costitutivi.....	9
1.4.2 Meccanismi di difesa inducibili	10
1.4.3 Geni di resistenza (R).....	11
1.4.4 Elicitori.....	16
1.4.5 Geni di avirulenza	16
1.5 Le risposte difensive delle piante.....	17
1.5.1 La risposta ipersensibile.....	17
1.5.2 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	18
1.5.3 Ossido Nitrico (NO).....	19
1.5.4 Acido Benzoico (BA) e acido Salicilico (SA)	19
1.5.5 Resistenza sistemica acquisita (SAR)	20
1.5.6 Proteine correlate con la patogenesi (PR)	21
1.5.7 Sintesi di fitoalessine.....	22
1.5.8 Modificazioni della parete cellulare vegetale.....	23
1.6 La struttura della parete cellulare vegetale.....	23
1.7 Enzimi implicati nella degradazione della parete cellulare.....	25
1.8 L'inibitore proteico delle poligalatturonasi (PGIP)	27
1.8.1 Le PGIP nel regno vegetale.....	29
1.8.2 La struttura della PGIP e relazione con altri prodotti genici LRR	30
1.8.3 Analisi strutturale dell'interazione PvPGIP2-PG fungine	31
1.9 Le biotecnologie vegetali	33
1.9.1 Miglioramento genetico tradizionale	33
1.9.2 Biotecnologie convenzionali.....	33
1.9.3 Ingegneria genetica	34
1.10 Trasformazione genetica del frumento.....	35

1.10.1 Scelta dell'espanto e coltura in vitro	36
1.10.2 Metodo di trasferimento del DNA.....	37
1.11 Scheda fitopatologia di di due patologie fungine a carico del frumento	45
1.11.1 Maculatura bruna dei cereali	45
1.11.2 Fusariosi dei cereali.....	47
1.12 Scopo del lavoro	49
2. MATERIALI E METODI	53
2.1 Preparazione del costrutto pUBISR2	53
2.2 Produzione di piante transgeniche.....	53
2.2.1 Terreni di coltura	53
2.3 Espianti, bombardamento e rigenerazione delle piante	55
2.3.1 Isolamento degli embrioni.....	55
2.3.2 Preparazione dei microproiettili e bombardamento.....	55
2.4 Controllo e crescita delle piante transgeniche	62
2.5 Estrazione degli acidi nucleici.....	62
2.5.1 Estrazione di DNA totale	62
2.5.2 Estrazione RNA totale.....	63
2.5.3 Estrazione e purificazione DNA plasmidico	64
2.5.4 Estrazione di Mediprep di DNA plasmidico	64
2.6. Metodo di analisi di acidi Nucleici.....	65
2.6.1 Elettroforesi su gel di agarosio	65
2.6.2 Elettroforesi su gel d'agarosio contenente formaldeide	65
2.6.3 Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio.....	65
2.6.4 Digestione con enzimi di restrizione	66
2.6.5. Southern blotting	66
2.6.6. Ibridazioni molecolari	67
2.6.7 Marcatura del clone pBS219 mediante PCR.....	68
2.6.8 RT-PCR.....	69
2.6.9 Sviluppo di oligonucleotidi specifici.....	71
2.7 Determinazione enzimatica dell'attività della PvPGIP2	72
2.7.1 Estrazione delle proteine totali dalle foglie	72
2.7.2 Saggio Bradford	72
2.7.3 Saggio di diffusione su agarosio	72
2.7.4 Saggio degli zuccheri riducenti	73
2.7.5 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS	73
2.7.6 Colorazione con Nitrato d'Argento	74
2.7.7 Western blot	74

2.7.8 Saggio degli Uronidi	75
2.7.9 Estrazione liquido extracellulare	76
2.7.10 Saggio della Glucosio-6 Fosfato Deidrogenasi (G6PD)	76
2.8 Infezioni delle piante transgeniche.....	77
2.8.1 Coltura in vitro dei funghi <i>Fusarium. graminearum</i> e <i>Bipolaris sorokiniana</i> e preparazione inoculo.....	77
2.8.2 Crescita delle piante	78
2.8.3 Test di virulenza su spiga con <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Bipolaris sorokiniana</i>	78
2.8.4 Test di virulenza su foglia con <i>Bipolaris sorokiniana</i>	78
2.9 Analisi statistica dei dati	79
3. RISULTATI.....	83
3.1 Produzione di piante transgeniche	83
3.1.1 Preparazione dei costrutti da utilizzare per la trasformazione genetica	83
3.1.2 Generazione delle piante transgeniche.....	85
3.1.3 Selezione delle piante transgeniche	85
3.2 Scelta delle linee per le successive analisi	89
3.3 Presenza del gene marcatore	90
3.3 Analisi dell'espressione della PvPGIP2 transgenica.....	91
3.3.1 Saggi di inibizione delle linee selezionate	91
3.3.2 Analisi mediante Western blot.....	92
3.4 Analisi dell'espressione della PvPGIP2 nei diversi tessuti delle piante transgeniche di frumento.....	93
3.5 Analisi fenotipica delle piante transgeniche.....	95
3.6 Localizzazione sub-cellulare della PvPGIP2	99
3.7 Attività idrolitica della PG di <i>Fusarium moniliforme</i> sul tessuto delle piante transgeniche.....	102
3.8 Analisi dell'espressione del gene <i>Pvpgip2</i> e dei geni <i>pgip</i> endogeni di frumento mediante RT-PCR.....	103
3.9 Risposta delle piante transgeniche all'infezione con <i>Bipolaris sorokiniana</i> e <i>Fusarium graminearum</i>	104
3.9.1 Infezione su tessuto fogliare con <i>Bipolaris sorokiniana</i>	104
3.9.2 Infezione su spiga con <i>Bipolaris sorokiniana</i> e <i>Fusarium graminearum</i>	107
3.10 Incrocio della linea J82-23a con la linea di frumento transgenico AGIV	118
4. DISCUSSIONE.....	123
5. CONCLUSIONI.....	131
6. BIBLIOGRAFIA	133

RIASSUNTO

Uno dei requisiti necessari per lo sviluppo di una agricoltura sostenibile è l'uso di varietà di piante resistenti ai microrganismi patogeni. Per la costituzione di genotipi resistenti è auspicabile rafforzare quei sistemi naturali di difesa che presiedono al controllo contemporaneo di differenti patogeni. Uno di questi è rappresentato dalla parete delle cellule vegetali che costituisce il primo ostacolo per la maggior parte dei funghi fitopatogeni sia nella fase di penetrazione dell'ospite sia nel corso della colonizzazione del tessuto. Il patogeno, a tal fine, produce degli enzimi in grado di degradare la parete delle cellule vegetali; tra i quali le endopoligatturonasi rivestono un ruolo fondamentale poiché, in molti casi, la loro azione è prioritaria rispetto ad altri enzimi degradativi.

La PGIP (Inibitore Proteico della Poligatturonasi) è una proteina presente nelle pareti cellulari delle piante in grado di inibire l'attività delle PG. La PGIP è in grado sia di legare specificamente e reversibilmente le PG fungine rallentandone l'attività sia di rilasciare oligatturonidi con funzione elicitoria dalla parete cellulare innescando le risposte di difesa.

Per valutare l'efficacia di queste proteine nell'incrementare le risposte difensive del frumento nei confronti dei patogeni fungini, sono state prodotte 25 linee di piante transgeniche di frumento cv Bobwhite sovraesprimenti il gene *Pvpgip2* di fagiolo, che è l'inibitore con il più ampio spettro di riconoscimento tra gli inibitori sinora studiati. Delle linee prodotte ne sono state selezionate sei che sono state caratterizzate per i livelli di espressione e per la l'attività inibitoria della proteina transgenica. La PvPGIP2 è risultata correttamente localizzata nell'apoplasto, anche se con livelli variabili nelle linee, e mantiene le sue peculiari caratteristiche di riconoscimento incrementando lo spettro d'inibizione nei confronti delle PG. *In vivo*, la PvPGIP2 transgenica interagisce con la PG di *F.moniliforme* e ne limita l'attività idrolitica sui tessuti delle piante transgeniche.

Tre delle linee (J82-23a, J82-200 e MJ7-4a) hanno mostrato una significativa riduzione della sintomatologia in seguito ad infezione con *Bipolaris sorokiniana* su foglie e spighe, e in una linea transgenica (J82-23a) l'accumulo di PvPGIP conferisce una parziale protezione nei confronti di *Fusarium graminearum* in seguito ad infezione su spiga.

Introduzione

1. INTRODUZIONE

1.1 . Il frumento

Il frumento (*Triticum spp.*) fu una delle prime specie domesticate a scopi alimentari. Il suo centro di origine, secondo Vavilov, comprende l'Etiopia, le sponde del mediterraneo e la zona transcaucasica. Oggi il frumento è coltivato approssimativamente per il 17% della superficie coltivabile mondiale con circa 240 milioni di ettari coltivati (FAOSTAT DATA 2005).

Linneo individuò 7 specie di frumento e le collocò tutte nel genere *Triticum*.

La svolta nella classificazione si ebbe quando fu possibile stabilire per i frumenti diploidi un genoma indicato con AA, per il tetraploide un genoma indicato con AABB (tra cui il *Triticum durum* o frumento duro) e per gli esaploidi un genoma contrassegnato da AABBDD (tra cui il *Triticum aestivum* o frumento tenero).

La specie selvatica che si ritiene possa aver donato il genoma DD è stata identificata con l'ancestrale selvatico *Aegilops squarrosa*, come donatore del genoma BB sono stati proposti molti candidati: *Ae. speltoides*, *Ae. bicornis*, *Ae. longissima*, *Ae. searsii*. Per quanto riguarda il genoma AA per lungo tempo sono stati due i candidati proposti: il *Triticum boeoticum* e il *T. urartu*; oggi, grazie soprattutto alle analisi del DNA è stato possibile identificare in quest'ultimo il donatore del genoma A..

La latitudine ottimale di coltivazione del frumento è compresa tra 30° e 60°N e tra 27° e 40° S anche se di fatto la coltivazione si è estesa anche in zone non propriamente adatte grazie all'elevata adattabilità della specie.

La temperatura di crescita è circa 25°C con una T minima e massima rispettivamente di 3-4°C e 30-32°C. Il grano si adatta ad un ampio spettro di condizioni di umidità anche se la maggior parte della sua coltivazione avviene in zone in cui la media delle precipitazioni annue si aggira intorno ai 375-875mm di pioggia.

Il frumento viene classificato in invernale o primaverile-estivo a seconda del periodo idoneo per la coltivazione. Per la coltura invernale il periodo di semina coincide con il mese di novembre e la raccolta al mese di giugno, la pianta resta durante l'inverno in fase vegetativa e riprende il ciclo vegetativo in primavera compatibilmente con le temperature indicate. I frumenti primaverili invece vengono normalmente seminati in primavera e raccolti in tarda estate.

Il frumento costituisce una delle fonti principali di calorie e proteine nell'alimentazione umana oltre che di vitamine e minerali e grazie alla sua peculiare componente, il glutine, permette la produzione di pane, pasta, biscotti ecc.

La sua importanza alimentare dipende anche dal fatto che è facile da stoccare, e di facile trasformazione.

1.2 Stadi fenologici del frumento: la scala Zadoks

Il percorso della pianta dalla germinazione alla maturazione è descritto convenzionalmente in relazione alle fasi di sviluppo o alla crescita.

Le fasi di sviluppo descrivono le variazioni di struttura della pianta attraverso l'identificazione di stadi ben definiti, che esprimono l'evoluzione morfologica della stessa dall'emergenza alla senescenza.

Lo sviluppo è rilevato comunemente da scale tra cui la più diffusa per descrivere il ciclo dei cereali è rappresentata dalla scala Zadoks (Chang et al 1974) che suddivide la pianta in 10 fasi: (0) Germinazione, (1) sviluppo della pianta, (2) accestimento, (3) levata ed emissione della foglia a bandiera, (4) botticella, (5) spigatura, (6) antesi (7) maturazione latte, (8) maturazione cerosa, (9) maturazione fisiologica. Ognuno di queste fasi è poi suddivisa in sottofasi da 1 a 9 che suddividono la fase principale e che descrivono l'evolversi delle singole strutture dalla fase iniziale al loro completamento. Per esempio una pianta in stadio di sviluppo viene indicata nella scala Zadoks con la cifra principale 1, mentre la seconda cifra indica il numero delle foglie emesse. Per essere considerata la foglia deve essere per il 50% emessa. Per quanto riguarda la fase di accestimento (2) la seconda cifra indica il numero di culmi di accestimento presenti nella pianta.

Una stessa fase di sviluppo può coincidere con due numerazioni e cioè due valori della scala : nell'esempio precedente quella riferita alla fase di sviluppo della pianta e a quella di accestimento. La combinazione di diverse numerazioni incrementano la precisione della descrizione della fase fenologica in cui si trova la pianta.

Ad esempio una pianta con un culmo di accestimento con tre foglie può essere descritta sia con gli stadi Zadoks 13 che 21 (Fig.1).

Spesso le fasi fenologiche sono riferite ad un'altra scala altrettanto nei tempi passati utilizzata ed è quella di Feekes che è stata ormai soppiantata dalla scala Zadoks.

Nella tabella di seguito è riportata la scala Zadoks con la corrispondente scala di Feekes (Large et al., 1954).

Tabella 1. Riassunto del codice a due cifre Zadoks con il corrispettivo nella scala di Feekes

Codice Zadoks		Descrizione	Corrispettivo Scala Feekes
Stadio principale	Stadio secondario		
0		Germinazione	
	0	Cariosside secca	
	1	Inizio dell'assunzione di acqua	
	5	Emissione radichette	
	7	Emissione coleoptile	
	9	Abbozzo prima foglia	
1		Sviluppo della piantina	1
	0	La prima foglia emerge dal coleoptile	
	1	Prima foglia emersa per il 50%	
	2	Seconda foglia emersa per il 50%	
	3	Terza foglia emersa per il 50%	
	4	Quarta foglia emersa per il 50%	
	5	Quinta foglia emersa per il 50%	
2		Accestimento	2
	0	Culmo principale	
	1	Germoglio principale più un culmo di accestimento	
	2	Germoglio principale più due culmi di accestimento	
	3	Germoglio principale più tre culmi di accestimento	
	4	Germoglio principale più quattro culmi di accestimento	
	5	Germoglio principale più cinque culmi di accestimento	3
3		Allungamento del culmo	
	1	Primo nodo visibile	6
	2	Secondo nodo visibile	7
	3	Terzo nodo visibile	
	7	Abbozzo foglia a bandiera	8
	9	Auricola della foglia a bandiera appena visibili	9
4		Stadio della botticella	
	1	Apertura della guaina fogliare della foglia a bandiera	
	3	Botticella in stadio di rigonfiamento	

(continua)Tabella 1. Riassunto del codice a due cifre Zadoks con il corrispettivo nella scala di Feekes

Codice Zadoks		Descrizione	Corrispettivo Codice Feekes
Stadio principale	Stadio secondario		
5	5	Piena botticella	10
	7	Apertura della foglia a bandiera	
	9	Prime reste visibili	
		Emergenza della spiga	
	1	Prima spighetta della spiga appena visibile	10.1
6	3	Spiga per un quarto emersa	10.2
	5	Spiga per metà emersa	10.3
	7	Spiga per tre quarti emersa	10.4
	9	Spiga emersa completamente	10.5
		Fioritura (in orzo non visibile)	
7	1	Inizio della fioritura	10.5.1
	5	Metà dei fiori sono in antesi	10.5.2
	9	Fioritura completata	
		Cariosside in maturazione lattea	
	1	Cariosside in stadio acquoso	10.5.4
8	3	Maturazione lattea precoce	
	5	Maturazione lattea intermedia	11.1
	7	Maturazione lattea tardiva	
		Maturazione cerosa	
	3	Maturazione cerosa precoce	
9	5	Maturazione cerosa anticipata	11.2
	7	Maturazione cerosa la cariosside perde il colore verde	
	9	Maturazione fisiologica precoce	
		Maturazione fisiologica	
	1	Cariosside vitrea (non si incide con l'unghia)	11.3
	2	Maturazione piena	11.4

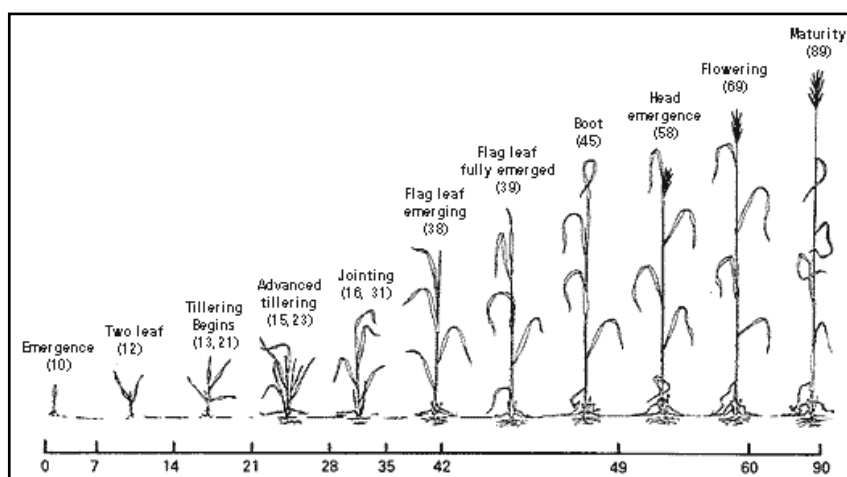


Fig.1 Ciclo vegetativo del frumento, tra parentesi è indicato lo stadio vegetativo Zadoks sotto il tempo necessario per passare da uno stadio vegetativo all'altro. Tratta da: <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC2548.html>

1.3 Interazione pianta-patogeno

Le piante sono costantemente soggette a stress di varia natura sia abiotici che biotici.

Guardando più da vicino la componente biotica dello stress, è facile comprendere che la manifestazione di una malattia può essere considerata come l'interazione di un sistema dinamico tridimensionale composto da: ambiente, variabilità genetica del parassita, variabilità genetica dell'ospite.

L'ambiente, che è l'insieme dei fattori climatici, fisici e biologici, favorisce od ostacola l'insorgere della malattia. La componente ambientale è spesso una componente chiave nel determinare la resistenza o la malattia.

I parassiti si distinguono in "obbligati", ad alta specificità, incapaci di svilupparsi al di fuori dell'ospite, e "facoltativi", che compiono il loro ciclo vitale in determinati tessuti dell'ospite, ma possono svilupparsi anche in altri tessuti o su altre specie.

In una stessa specie esistono, inoltre, entità patogeniche identiche morfologicamente ma differenti nella capacità di attaccare le cultivar della pianta ospite. Da questo deriva la differenziazione di patogenicità in forme specifiche del parassita e pertanto il concetto di razze del patogeno.

L'ospite ovvero la pianta ha evoluto nel tempo sofisticatissimi meccanismi che consentono loro di percepire gli attacchi provenienti dall'esterno e tradurre il segnale in una risposta adattativa. La resistenza che la pianta oppone al patogeno è sostanzialmente classificabile in due tipi:

- la resistenza "non ospite"
- la resistenza "ospite"

La resistenza “non ospite” può essere dovuta a caratteristiche morfologico-strutturali delle piante che impediscono al patogeno di penetrare nei tessuti, alla presenza nei tessuti della pianta di molecole tossiche al patogeno, oppure all’efficacia delle risposte difensive della pianta stessa. L’organismo che attacca la pianta diventa patogeno grazie all’acquisizione della capacità di penetrare con successo nell’ospite, di tollerare o inattivare le molecole tossiche presenti nell’ospite, di sopprimere le risposte difensive della pianta e di crescere e svilupparsi a spese della pianta ospite. I fattori determinanti il successo del processo infettivo sono denominati fattori di patogenicità ed i geni codificanti tali fattori sono definiti geni di patogenicità. Essi sono definiti tali quando, una volta inattivati, determinano l’incapacità del patogeno di determinare la malattia. Se, invece, la loro inattivazione determina solo una diminuzione dei sintomi della malattia, i geni si dicono di virulenza.

La resistenza ospite si manifesta quando una razza della specie patogena determina la malattia in una cultivar specifica della pianta ospite (Heath, 1981). La resistenza razza-cultivar è regolata da specifiche interazioni che coinvolgono i geni *Avr* del patogeno e alleli che corrispondono ai loci dei geni di resistenza (*R*) nelle piante.

Una razza di patogeno è detta virulenta se è in grado di determinare la malattia nell’ospite, è detta avirulenta se la malattia è bloccata nelle primissime fasi grazie all’attivazione di specifici meccanismi di difesa.

L’interazione tra una razza di patogeno virulenta ed una cultivar suscettibile è detta compatibile, mentre l’interazione tra una razza avirulenta ed una cultivar resistente è detta incompatibile.

I meccanismi biochimici e le modificazioni strutturali in grado di contrastare l’azione del patogeno sono attivate nell’ospite in seguito ad un processo di riconoscimento del patogeno.

1.3.1 Le basi genetiche dell’interazione pianta-patogeno

Dopo la scoperta del lavoro di Mendel i genetisti dagli inizi del ventesimo secolo riconobbero che la resistenza ai fitopatogeni veniva spesso ereditata come un singolo tratto dominante o semidominante. Ma fu solo agli inizi degli anni 40 che Flor spiegò l’ereditarietà della resistenza e il meccanismo di interazione tra geni *Avr* del patogeno ed *R* delle piante. Flor propose il modello “gene per gene” (Fig.2) secondo il quale, affinché si sviluppi la reazione di ipersensibilità è necessario che il gene di resistenza (*R*) della pianta e quello di avirulenza del patogeno (*Avr*) si presentino nelle loro forme alleliche dominanti. (Flor, 1955) Infatti, se uno o entrambi i geni sono presenti in forma omozigote recessiva, la resistenza non si manifesta, in quanto la pianta non è in grado di percepire la presenza del patogeno (Keen, 1990). Un gene di avirulenza (*Avr*), è quindi un gene in forma dominante che è in grado di stabilire interazione con l’ospite ma è incapace di portare a termine con successo l’invasione della pianta ospite in cui è presente un allele dominante; mentre si definisce gene di virulenza (*Avr*), la coppia recessiva del

gene, che permette all' invasore di non essere rigettato dall'ospite, il quale viene attaccato con successo. (Keen, 1990).

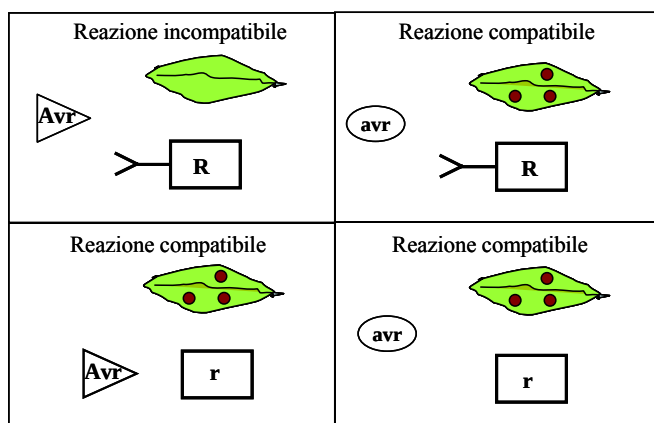


Fig 2 Schema di resistenza : si ha risposta di resistenza solo quando il gene di Resistenza (R) è in forma dominante così come il gene di Avirulenza del patogeno

Per i patogeni che utilizzano tossine ospite-specifiche durante la fase di patogenesi è stato proposto un modello diverso. In questo caso, la virulenza del patogeno deve essere dominante affinché una tossina o un enzima funzionale (od entrambe) possa essere prodotta per provocare la malattia. A sua volta la resistenza della pianta è ereditata prevalentemente come un tratto dominante ed è ottenuta attraverso la detossificazione enzimatica o tramite la perdita o l'alterazione della tossina del patogeno.

1.4 Meccanismi di difesa della pianta

Dall'interazione dei fattori di resistenza, presenti nell'ospite, con quelli corrispondenti di avirulenza, portati dal parassita, può risultare una relazione compatibile o incompatibile cioè di suscettibilità o resistenza. Sia nella reazione compatibile che incompatibile le piante si difendono dall'attacco dei patogeni mettendo in atto strategie difensive che possono essere diverse a seconda del patogeno (funghi, batteri, virus) e delle proprie caratteristiche genetiche. In generale esse si oppongono ai patogeni combinando caratteristiche strutturali che agiscono come barriere fisiche contro l'invasione del patogeno, e con reazioni biochimiche che conducono, nella maggior parte dei casi, alla produzione di sostanze tossiche per il patogeno.

I meccanismi di difesa messi in atto dalla pianta possono essere suddivisi in:

- Meccanismi pre-infezionali o costitutivi che sono già attivi al momento dell'infezione;
- Meccanismi post-infezionali o indotti che vengono attivati solo dopo l'infezione.

1.4.1 Meccanismi di difesa costitutivi

Alcune strutture fisiche dell'ospite, costituiscono la prima linea di difesa contro l'invasione del patogeno impedendone la penetrazione. Tra queste le più importanti sono: lo spessore della

parete cellulare, la cuticola, che ricopre le cellule epidermiche, le cere, che formano all'esterno della cuticola uno strato idrofobico che impedisce la formazione di film d'acqua talvolta necessari per la sopravvivenza e la penetrazione del patogeno. L'eventuale presenza di uno strato di tomentosità superficiale può coadiuvare la funzione difensiva delle cere.

Molti funghi e la totalità dei batteri patogeni, penetrano nell'ospite passivamente attraverso aperture naturali come stomi, lenticelle, idatodi e nettari; pertanto è evidente il ruolo delle barriere strutturali nella difesa di patogeni capaci di penetrazione attiva.

Nei confronti di tutti i patogeni, invece, riveste grande importanza la resistenza svolta tramite sostanze metaboliche (metaboliti secondari) presenti normalmente nelle cellule vegetali (Schonbeck et al., 1986). Alcune di queste molecole sono contenute negli essudati e possiedono attività fungitossica, impedendo la germinazione delle spore di alcuni funghi o l'allungamento del tubetto germinativo (Agrios, 1997).

Altre sostanze inibitrici sono presenti nelle cellule vegetali prima dell'attacco del patogeno. Ad esempio numerosi composti fenolici e tannici sono contenuti ad alte concentrazioni nelle cellule di giovani frutti o foglie e possono essere responsabili della resistenza di questi tessuti a determinati organismi patogeni (Agrios, 1997). Molti di questi composti sono dei potenti inibitori di enzimi idrolitici, alcuni dei quali possiedono attività macerante. Quando i tessuti invecchiano, perdono il loro contenuto di inibitori e così la loro resistenza all'infezione (Nicholson e Hammeschmidt, 1992).

Vi sono poi altri composti preformati, come ad esempio i flavonoidi, gli alcaloidi, e le saponine, che hanno attività antifungina.

D'altro canto, le cellule vegetali contengono enzimi idrolitici come le glucanasi e la chitinasi che sono in grado di degradare la parete cellulare del patogeno contribuendo così alla resistenza (Lawrence et al., 2000).

1.4.2 Meccanismi di difesa inducibili

L'attivazione dei meccanismi di difesa inducibili prevede tre tappe distinte:

- RICONOSCIMENTO (la pianta percepisce la presenza del patogeno);
- TRASMISSIONE DEL SEGNALE (la pianta diffonde tale informazione all'interno delle cellule situate nel sito d'infezione);
- INDUZIONE (la pianta induce una serie di modificazioni, sia localizzate a livello del sito d'infezione che sistemiche, che agiscono in concerto per bloccare l'infezione).

Per poter attivare una rapida risposta di difesa al sito d'infezione del patogeno, ogni pianta necessita di un sofisticato sistema di sorveglianza che abbia evoluto la capacità di poter

discriminare la presenza di segnali endogeni e segnali dovuti alla presenza del patogeno. Inoltre in molti casi, quando la pianta percepisce dei segnali di allerta che indicano la presenza di un organismo estraneo, deve avere l'ulteriore capacità di saper distinguere tra microrganismi pericolosi e microrganismi benefici, come ad esempio i batteri del genere *Rhizobium* (per le specie leguminose) o le specie fungine micorriziche.

E' ormai generalmente accettato che nella resistenza a livello di cultivar, come in quella a livello di specie, l'evento di riconoscimento viene mediato da segnali prodotti dal patogeno e molecole recettrici presenti nella pianta. Segnali e recettori svolgono il proprio ruolo a livello delle superfici di contatto tra i due organismi, impegnando compartimenti cellulari quali la parete e la membrana plasmatica.

L'interpretazione dell'ipotesi gene per gene di Flor, secondo il modello "recettore-elicitore", attribuisce al prodotto del gene di resistenza la funzione di recettore ed al prodotto del gene di avirulenza quella di elicitore. In realtà l'ipotesi di un'interazione diretta tra prodotto del gene di resistenza e prodotto del gene di avirulenza è stata dimostrata finora solo in un caso (Jia et al., 2000).

1.4.3 Geni di resistenza (R)

Nel regno vegetale sono presenti migliaia di geni di resistenza, ognuno specifico per un patogeno batterico, fungino, virale o nematode. Nonostante l'ampia gamma di organismi patogeni esistenti e la grande varietà delle presunte molecole effettrici di patogenicità, i geni di resistenza isolati codificano solamente per poche classi principali di molecole proteiche (Tabella 2).

I prodotti proteici codificati da questi geni rientrano in due categorie principali:

- 1) Agenti detossificanti (es : Hm1) (Johal e Briggs, 1992).
- 2) Prodotti proteici bifunzionali, con funzione di riconoscimento e di trasmissione del segnale (Baker et al., 1997; Ellis e Jones, 1998) che dovrebbe condurre all'induzione dei geni di difesa.

I prodotti dei geni di resistenza appartenenti alla seconda classe possono essere ulteriormente suddivisi in quattro sottoclassi in base ai loro domini strutturali (Fig.3).

La prima sottoclasse (Fig 3 #1), il cui rappresentante è il prodotto del gene Pto di pomodoro (Martin et al., 1993), è costituita da chinasi citoplasmatiche del tipo Ser/Thr, ancorate al lato interno della membrana tramite molecole lipidiche.

La seconda sottoclasse (Fig.3 #2) è costituita da proteine aventi motivi ripetuti ricchi in residui di leucina LRR (Leucine reach repeat,) (Kobe e Deisenhofer, 1994) nel loro dominio extra-cellulare.

La terza sottoclasse (Fig.3 #3) è rappresentata dai prodotti dei geni di resistenza contenenti nella regione N-terminale un dominio di legame dei nucleotidi NBS (Nucleotide Binding Site) (Saraste et al.1990), seguito da un dominio LRR. I membri di questa classe possono essere ulteriormente suddivisi:

- Motivo a serratura di leucina LZ (Leucine zipper) (Alber, 1992)
- N-terminale simile al dominio di segnalazione citoplasmatico di Toll di *Drosophila* e del recettore per l'interleuchina 1 (IL- 1R) di mammifero.

La quarta sottoclasse (Fig.3 #4) è quella che comprende prodotti proteici transmembrana con motivi LRR nella parte extracellulare e un dominio chinasi citoplasmatico. Il dominio LRR è spesso implicato nelle interazioni proteina- proteina e si ritiene sia il fattore principale responsabile della specificità del riconoscimento del patogeno (Martin, 1999). Questi domini LRR funzionerebbero quindi da molecole recettoriali in grado di trasmettere il segnale al dominio chinasi citoplasmatico per l'ulteriore amplificazione (Jones and Jones, 1997).

Anche il dominio LZ è coinvolto probabilmente nelle interazioni proteina-proteina. Ha un ruolo nell'omo ed etero-dimerizzazione dei fattori di trascrizione, e potrebbe così portare alla formazione di eterodimeri tra proteine R ed altre proteine con questo dominio.

Il dominio NBS è presente anche in numerose ATP e GTP binding proteins (Traut, 1994). Il ruolo di questo dominio, non è ancora chiaro, potrebbe determinare l'attivazione di chinasi. Queste ultime potrebbero essere coinvolte nel processo di trasduzione del segnale che porta all'attivazione delle risposte difensive (Bent, 1996).

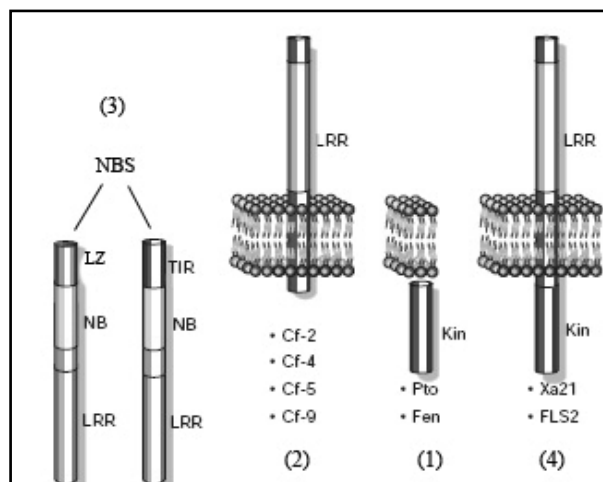


Fig.3 Rappresentazione e allocazione della classi principali di geni di resistenza motivi costituiti da: (1) chinasi citoplasmatiche del tipo ser/thr, ancorate al lato interno della membrana tramite molecole lipidiche; (2). proteine aventi motivi ripetuti ricchi in residui di leucina LRR; (3) prodotti dei geni di resistenza contenenti nella regione N-terminale un dominio di legame dei nucleotidi NBS; (4) prodotti proteici transmembrana con motivi LRR nella parte extracellulare e un dominio chinasi citoplasmatico. Abbreviazioni usate **NBS**:dominio di legame dei nucleotidi; **LZ**: dominio a serratura di leucina; **LRR**:dominio ricco in residui di leucina, **Kin** dominio chinasi. Foto tratta e modificata da (Dangl et al, Nature 2001)

Tabella.2 Le classi dei geni di resistenza e i loro domini strutturali LRR (Leucine reach repea); LZ (Leucine zipper); NBS (Nucleotide binding site); TIR (Toll / IL-1R).

Classe	Gene R	Pianta	Patogeno e gene Avr	Struttura del gene R
1	<i>Hm1</i>	Mais	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Enzima detossificante
2	<i>Pto</i>	Pomodoro	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tomato (avr Pto)</i>	Chinasi serina-treonina intercellulare
2a	<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tomato (avr Rpt2)</i>	Proteina intercellulare
	<i>RPM</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. maculicola</i> <i>(avr Rpm1/Avr B)</i>	LRR/LZ/NBS
2b	<i>N</i>	Tabacco	<i>TMV</i>	Proteina intercellulare
	<i>L6</i>	Lino	<i>Melampsora lini</i>	
	<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	LRR/LZ/TIR
2c	<i>Cf-9</i>	Pomodoro	<i>Cladopsorium fulvum</i>	Proteina con dominio LRR extracellulare
	<i>Cf-2</i>		<i>(Avr9, Avr2, Avr4, Avr5)</i>	
	<i>Cf-4</i>			
	<i>Cf-5</i>			
2d	<i>Xa21</i>	Riso	<i>Xanthomonas oryzae</i> <i>pv. oryzae</i>	Proteina con dominio LRR extracellulare e chinasi citoplasmatica

Struttura LRR

I domini LRR sono stati trovati in numerose proteine e si ritiene che costituiscano i siti in cui avvengono le interazioni proteina-proteina, i legami peptide-ligando, le interazioni proteina-carboidrati (Jones & Jones, 1997; Kajava, 1998).

Le proteine LRR mostrano una struttura modulare con ripetizioni in numero variabile di una sequenza consenso di 24 amminoacidi per i domini LRR extra-citoplasmatici e 23 amminoacidi per i domini LRR citoplasmatici.

Le informazioni che si hanno oggi circa l'organizzazione tridimensionale delle LRR e sulla modalità d'interazione proteina-proteina, sono derivate da studi ai raggi X condotti sull'inibitore della ribonucleasi estratto da fegato di maiale. Sulla base di tali studi, si è potuto stabilire che ogni LRR dà luogo, nella struttura terziaria, ad un alfa elica e ad un filamento beta uniti da un ansa con sequenza poco conservata. Le varie unità LRR nel dominio si dispongono in maniera tale che tutti i filamenti beta e tutte le alfa eliche siano parallele ad un asse comune, generando una struttura aperta a forma di ferro di cavallo. La natura aperta, non globulare, di tale struttura, fornisce una vasta superficie d'interazione con altre molecole.

All'interno della ripetizione LRR, c'è una sub-regione con una sequenza consenso xxLxLxx nota come "beta-strand/beta-turn", che si pensa essere una regione chiave nel riconoscimento. Si ritiene, infatti che nel dominio xxLxLxx i residui di L occupino il core idrofobico della proteina, mentre gli altri residui x formino una interfaccia esposta al solvente che può essere coinvolta nel legame con altre macromolecole proteiche.

Sulla base di confronti di sequenza condotti sui diversi geni R, si è potuto riscontrare che gli amminoacidi X nella regione xxLxLxx sono ipervariabili. Sulla base di questi dati si è ipotizzato che questa regione sia in continua evoluzione e che medi il riconoscimento con i ligandi di origine patogena, anch'essi in continua evoluzione.

Le proteine contenenti il motivo LRR non sono peculiari del regno vegetale, esse infatti sono molto diffuse anche tra i microrganismi e gli animali dove sono coinvolte in una grande varietà di importanti funzioni, quali: la trasduzione del segnale, l'adesione cellulare, la riparazione del DNA, la ricombinazione, la trascrizione e il processamento dell'RNA. La caratteristica che accomuna tutte queste proteine è la loro capacità di mediare interazioni proteina-proteina. In particolare nelle piante i motivi LRR si trovano non solo in proteine con importanti funzioni di resistenza e di difesa contro i microrganismi invasori, ma anche in proteine anticongelamento della carota, in recettori chinasi coinvolti nel riconoscimento di steroidi e ormoni peptici, nello sviluppo, in risposte di difesa contro insetti o nella simbiosi con batteri o funghi (Di Matteo et al., 2003).

In tutte le proteine LRR finora descritte, la sequenza consenso per le unità ripetute è sorprendentemente simile considerando lo spettro di organismi e l'ampia diversità funzionale di

queste proteine. La grande somiglianza tra queste proteine indica una forte pressione selettiva per la conservazione di questa struttura.

1.4.4 Elicitori

Per cercare di comprendere la natura dell'evento di riconoscimento necessario per indurre la risposta di resistenza, sono state caratterizzate numerose molecole in grado di attivare le risposte difensive delle cellule vegetali denominati elicitori.

Tra gli elicitori di natura carboidratica figurano frammenti di pareti fungine (β -glucani, frammenti di chitina o chitosani); o di pareti delle cellule vegetali come i frammenti di sostanze pectiche (oligogalatturonidi). Altri elicitori rilasciati dai microorganismi patogeni sono di natura lipidica o glicoproteica (Parker et al 1991).

La maggior parte degli elicitori sono aspecifici in quanto sono in grado di indurre le risposte di difesa in molte specie di piante, mentre quasi tutti gli elicitori specifici finora identificati sono molecole la cui sintesi è sotto il controllo dei geni *Avr* dei microorganismi patogeni. Gli elicitori specifici inducono le risposte difensive solo nelle piante che possiedono il gene *R* complementare.

1.4.5 Geni di avirulenza

Le molecole codificate dai geni *Avr* fino ad oggi caratterizzati, non consentono di fare una classificazione ben precisa come quella fatta per i prodotti dei geni di resistenza. Si tratta infatti di molecole molto diverse tra loro prive di motivi strutturali ricorrenti. Tale diversità è indice probabilmente di meccanismi di azione e funzione differente.

Le informazioni più ampie che si hanno circa i prodotti dei geni *Avr* riguardano i virus delle piante. In questi patogeni sono state identificate come prodotti di geni di avirulenza proteine che fanno parte del capsido proteico, proteine deputate alla replicazione dell'RNA e proteine coinvolte nel movimento del virus (Ellis et al., 2000).

Nel caso di alcuni patogeni batterici, è stato osservato che l'attività di molti geni di avirulenza dipende dalla presenza di particolari vie di secrezione, come ad esempio il sistema di secrezione Hrp (Hypersensitive response and pathogenicity) implicato nella produzione di proteine Hrp che trasferiscono i prodotti dei geni *Avr* nelle cellule della pianta (Vivian e Arnold, 2000).

Nei funghi sono stati finora caratterizzati pochi geni *Avr*, alcuni dei quali controllano la sintesi di peptidi secreti dal fungo.

Risulta abbastanza ovvio che possedere geni *Avr* non rappresenta un vantaggio per il patogeno in quanto è la loro espressione che determina l'insuccesso dell'attacco. Una possibile spiegazione di questa contraddizione è che in molti casi i prodotti di questi geni svolgono una funzione importante per la replicazione o la crescita del microorganismo. Tale funzione evidente

nel caso dei geni *Avr* virali prima citati, è stata osservata anche per alcuni geni *Avr* batterici e fungini, infatti l'assenza dei prodotti di questi geni è in grado di pregiudicare la capacità del patogeno di accrescersi sulle piante.

1.5 Le risposte difensive delle piante

1.5.1 La risposta ipersensibile

Una reazione di tipo incompatibile è spesso accompagnata dal manifestarsi della risposta ipersensibile (HR), nella quale le cellule che circondano il sito d'infezione muoiono rapidamente, privando il patogeno di nutrienti ed impedendo la sua propagazione. A seguito di una risposta ipersensibile compiuta con successo rimane, nel sito d'invasione, una piccola zona formata da cellule morte, ma il resto della pianta è salvo. È stato osservato che la HR può svolgere un ruolo molto importante nella resistenza alle malattie. Nelle interazioni con i patogeni biotrofi obbligati, in cui si attua un'associazione intima tra il patogeno e le cellule della pianta, la morte cellulare che ha luogo nel sito di contatto impedisce l'accesso del patogeno ai nutrienti. Nelle interazioni con i patogeni necrotrofi o embiotrofi il ruolo della HR sembra essere meno chiaro, proprio perché tali patogeni ricavano nutrienti dalle cellule morte. Comunque, la compartimentalizzazione cellulare che si attua a seguito della HR può determinare l'accumulo di molecole tossiche nel sito di contatto e arrestare così l'invasione di questi patogeni. Infatti, nelle cellule che rispondono in maniera ipersensibile si osserva perdita di permeabilità di membrana, aumento della respirazione cellulare, accumulo ed ossidazione di composti fenolici.

Sebbene la HR sia una caratteristica comune in numerose reazioni di resistenza, non è una componente necessaria. Numerose risposte di resistenza come quelle mediate dal gene *mlo* di orzo nei confronti del fungo *Erysiphe graminis* f sp *hordei* si attuano senza il manifestarsi della HR (Knogge, 1996).

La risposta ipersensibile (HR) coinvolge in realtà una forma molto complessa di morte programmata delle cellule associata all'induzione di una risposta sistemica e localizzata di difesa (Heath 2000).

La risposta ipersensibile è comunemente controllata direttamente o indirettamente dall'interazione che avviene tra i prodotti dei geni di avirulenza del patogeno e i geni di resistenza della pianta, interazione che può portare a molteplici segnali di risposta della pianta. Flussi ionici e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) precedono comunemente la morte ma il loro diretto coinvolgimento nella risposta difensiva sembra variare in ciascun sistema pianta-patogeno.

1.5.2 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Numerosi studi sono stati effettuati per identificare le risposte precoci a seguito dell'attacco del patogeno. I primi eventi osservabili nella cellula è un flusso ionico attraverso la membrana cellulare e la produzione di specie reattivi all'ossigeno (ROS) tra cui l'anione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Scheel 1998); Tali composti, formati dalla riduzione dell'ossigeno molecolare, possono contribuire alla morte cellulare come parte di una risposta ipersensibile o, indipendentemente da una HR, possono entrare direttamente in azione uccidendo il patogeno.

E' importante sottolineare che la formazione di ROS si verifica normalmente nelle cellule; tuttavia le piante hanno sviluppato un sistema che da una parte regola la loro formazione e dall'altra ne regola lo smaltimento. A seguito però dell'attacco del patogeno, la pianta non è più in grado di regolare l'equilibrio produzione-smaltimento e ne consegue un sostanziale accumulo all'interno delle cellule.

Una delle prime prove della presenza di tali molecole, in particolare dell'anione superossido O_2^- deriva da studi condotti nell'interazione incompatibile tra piante di patata e il fungo *Phytophthora infestans* e nell'interazione tra piante di tabacco e il virus del mosaico del tabacco (TMV) (Doke., 1983; Doke and Ohashi, 1988). Studi successivi effettuati su culture cellulari (Levine et al., 1994; Murphy and Auh, 1996) hanno indicato che le piante sono in grado di produrre O_2^- a partire da ossigeno molecolare per mezzo di complessi ossidasici analoghi alle NADPH ossidasi dei neutrofili.

L' O_2^- generato dall'attività di queste proteine, dismuta velocemente a H_2O_2 sia in modo spontaneo sia attraverso catalisi mediata dall'enzima superossido dismutasi (SOD). Questi eventi portano ad un accumulo di H_2O_2 , una molecola che (avendo un elettrone spaiato) è in grado di legarsi alla membrana plasmatica e di diffondere all'interno delle cellule molto più rapidamente dell' O_2^- , che è una molecola carica.

Sono stati ipotizzati numerosi ruoli delle ROS nella risposta di difesa, ad esempio il consumo di ossigeno, l'induzione di fitoalessina e della resistenza sistemica acquisita, l'immobilizzazione delle proteine delle pareti cellulari, il cambio nella permeabilità della membrana e dei flussi ionici, ed anche un ruolo putativo nella risposta ipersensibile.

Ad esempio, l' H_2O_2 può risultare una molecola tossica per i patogeni ai livelli prodotti dalla pianta (Peng and Kuc, 1992); l' H_2O_2 può contribuire al rafforzamento strutturale della parete cellulare vegetale (Bolwell et al., 1995., Bradley et al 1992); inoltre l' H_2O_2 può agire da secondo messaggero nell'attivazione di geni di difesa, come ad esempio la 2-idrossilasi dell'acido benzoico, che è necessaria per la sintesi dell'acido salicilico (Leon et al., 1995) e la glutadione-S-transferasi, implicata nell'attivazione della risposta ipersensibile.

1.5.3 Ossido Nitrico (NO)

L'ossido nitrico è un'altra molecola la cui azione sembra essere molto importante nella risposta di difesa della pianta infatti, in numerose piante, a seguito dell'interazione con un patogeno avirulento è stata riscontrata una notevole sintesi *de-novo* di NO. Diversi studi sembrano indicare che l'NO è in grado di potenziare l'induzione della risposta ipersensibile determinata dalle ROS e di agire, indipendentemente da queste, per indurre la trascrizione di alcuni geni di difesa (Delledonne et al.,1998).

L'NO è in grado di reagire chimicamente con l' O_2^- e con l' H_2O_2 generando perossinitriti e radicali idrossilici, composti altamente tossici; inoltre, data la sua capacità d'interagire con i metalli di transizione come il Fe, Cu, Co e Mn, può andare ad influenzare l'attività di alcune proteine che li contengono.

Per quanto riguarda l'interazione NO e ROS nella induzione della HR, è stato osservato che in piante di tabacco, la somministrazione di NO esogeno potenzia l'espressione della morte cellulare indotta da H_2O_2 ed inoltre, in colture cellulari di soia cv Williams 82, l'utilizzo di enzimi animali inibitori delle ossidonitrico sintasi (NOS) blocca la HR indotta da *Pseudomonas syringae* (Delledonne et al.,1998). In quest'ultimo sistema è stato anche osservato che l'NO è in grado di attivare i geni della calcine sintasi (CHS) e della fenil alanina ammonia liasi (PAL), la cui espressione è indotta da patogeni ma non dall' H_2O_2 . L'NO è inoltre in grado di attivare altri geni coinvolti in maniera diretta o indiretta nei meccanismi di difesa, inclusi quelli che codificano per le proteine PR e per gli enzimi del metabolismo dei fenilpropanoidi, implicati nella sintesi della lignina, per composti antimicrobici e per l'acido salicilico.

1.5.4 Acido Benzoico (BA) e acido Salicilico (SA)

L'accumulo di BA e SA è stato riscontrato in numerose interazioni pianta-patogeno di tipo incompatibile; in particolare alti livelli di queste due molecole sono stati rinvenuti in prossimità del sito d'infezione. L'induzione di BA e SA viene frequentemente associata con la HR (Ryals et al 1996). La via metabolica che porta alla biosintesi di SA durante la risposta di difesa della pianta, non è ben conosciuta, ma la sua regolazione sembra essere differente a seconda del tipo di pianta.

L'acido salicilico deriva dalla via biosintetica dei fenilpropanoidi, ma è risultato che, almeno in tabacco, la sua sintesi non viene regolata al livello della trascrizione del gene della PAL.

Per quanto riguarda l'acido benzoico, il suo rilascio da un suo derivato coniugato determina l'induzione di una monossigenasi (BA2-H) che converte l'acido benzoico in acido salicilico. L'attività della BA2-H è fortemente indotta immediatamente prima della HR (Lèon et al., 1995). Comunque, in *Arabidopsis* e altre specie, i derivati coniugati dell'acido benzoico

sembrano essere assenti. In queste specie l'accumulo di SA implica l'attivazione di PAL (Mauch-Mani e Slusarenko, 1996).

Non è ben chiaro se la sintesi di SA sia una causa o una conseguenza della HR, i dati fino ad oggi disponibili sembrano indicare che entrambe le ipotesi potrebbero essere valide.

In piante transgeniche di tabacco e di *Arabidopsis* che esprimono in maniera costitutiva il gene batterico che codifica per l'enzima salicilato idrossilasi (nah-G) che converte SA in catecolo (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994), è stato osservato che il mancato accumulo di SA determina un notevole indebolimento di fenotipi di resistenza mediati da diversi geni R. Inoltre nelle piante che esprimevano il gene nah-G viene abolita l'induzione di numerosi geni correlati alla difesa (Ryals et al., 1996).

1.5.5 Resistenza sistemica acquisita (SAR)

Con il termine resistenza sistemica acquisita (SAR, Systemic Acquired Resistance) ci si riferisce ad un sistema di trasmissione specifico che svolge nelle piante un ruolo molto importante nel sistema di difesa. La SAR rappresenta una sorta di "sistema immunitario" delle piante che differisce dall'immunità acquisita negli animali, in quanto è meno specifica; infatti può essere efficiente contro un più ampio spettro di patogeni. La via di segnalazione che conduce all'attivazione della SAR viene innescata se, a seguito dell'infezione iniziale del patogeno, la pianta sviluppa una lesione necrotica che può essere o il risultato di una risposta ipersensibile, o semplicemente un sintomo della malattia (Kuc, 1982; Delaney et al 1994; Ryals et al 1995). E' stato osservato che, a seguito dell'attivazione della SAR, la pianta mostra una maggior resistenza nei confronti di numerosi patogeni. Nelle piante, la resistenza acquisita si sviluppa a seguito della pre-inoculazione della pianta con vari agenti biotici (patogeni) o dopo pre-trattamento con vari agenti chimici o fisici.

Questo tipo di resistenza è non specifica, inizialmente è ristretta all'area che circonda il sito di infezione (LAR, resistenza localizzata acquisita) ma, a distanza di pochi giorni, si estende sistemicamente lungo tutta la pianta (SAR) mediante la produzione, da parte delle cellule infettate, di un segnale floema - mobile, che porta all'accumulo di acido salicilico che sembra essere la molecola responsabile dell'induzione della SAR.

Infatti la somministrazione esogena di salicilato a piante di tabacco determina l'induzione della SAR. Le piante transgeniche esprimenti il gene nahG che codifica per l'enzima salicilato idrossilasi, inoltre, non sono in grado di accumulare il salicilato e non danno SAR. La resistenza sistemica acquisita, è caratterizzata dall'induzione di alcune famiglie di geni chiamate "SAR genes" che codificano, di norma, per proteine PR, e tra queste, in particolare, alcune β -1,3 glucanasi e chitinasi.

Da studi condotti *in vivo*, su piante di tabacco infettate con il virus del mosaico del tabacco (TMV) usando SA marcato con ^{14}C , è emerso che l'SA accumulato nelle foglie infettate, viene trasportato nei tessuti non infettati. Infatti l'aumento della concentrazione del 70% di SA osservato nelle foglie non infettate è dovuto a questa traslocazione.

Tuttavia altri studi condotti effettuando degli esperimenti d'innesto con le piante nahG sembrano indicare che l'SA non sia il segnale diffusibile di attivazione della SAR. Comunque, anche se l'SA non rappresenta il segnale di attivazione, è comunque necessario per la cascata di segnalazione che si attua a seguito della SAR (Vernooij et al., 1994) e che conduce all'induzione di numerosi geni che codificano per le proteine correlate con la patogenesi.

1.5.6 Proteine correlate con la patogenesi (PR)

Le proteine PR (pathogenesis-related) comprendono una serie di proteine a localizzazione intracellulare o extracellulare, accumulate nei tessuti della pianta o in colture cellulari a seguito dell'attacco di un patogeno o a seguito di un trattamento con elicitori di diversa natura (Bowles, 1990). L'accumulo delle proteine PR avviene non solo localmente al sito d'infezione, ma vengono indotte anche a livello sistemico in associazione con lo sviluppo della SAR sopradescritta.

L'induzione di queste proteine è stata riscontrata in numerose piante appartenenti a famiglie diverse; ciò ha indotto ad ipotizzare per le proteine PR un ruolo generale nella difesa delle piante nei confronti di vari stress biotici.

Una proteina viene inclusa nella famiglia delle PR solo se soddisfa due requisiti: viene indotta a seguito dell'attacco del patogeno in tessuti dove in condizioni normali non è presente e tale induzione si attua a seguito dell'attacco di almeno due razze di patogeni differenti. Tali proteine sono state classificate in diversi gruppi (da PR-1 a PR-14) a seconda del loro composizione aminoacidica e delle loro funzione biochimica.

Le prime proteine PR sono state identificate inizialmente come proteine inducibili dall'estratto di una foglia di tabacco che manifestava una reazione ipersensibile a seguito di un'attacco di Virus del mosaico di tabacco (TMV) (Van Loon, 1970).

Alcune proteine PR sono enzimi (chitinasi e glucanasi) che degradano i polisaccaridi strutturali delle pareti dei funghi fitopatogeni (PR-2 e PR-3); altre proteine PR come le difensine, hanno attività antimicrobica (PR-12) altre ancora intervengono nei processi di fortificazione della parete cellulare (PR-10) infine per alcune proteine PR non si conosce ancora l'esatta funzione.

Una caratteristica peculiare di queste proteine è la resistenza alla degradazione da parte delle proteasi.

I segnali che conducono all'attivazione dell'espressione dei geni che codificano per le proteine PR, sembrano essere diversi a seconda della famiglia di appartenenza; per alcune di esse il

segnale sembra coincidere con l'accumulo di SA (Malamy et al., 1990) e le proteine PR vengono secrete nell'apoplasto; per altre invece l'induzione sembra essere mediata dall'ormone etilene (Mamelink et al., 1990; Brederode et al., 1991; Eyal et al., 1992) che si è rivelato essere un segnale chiave nella risposta di resistenza da parte della pianta. Recentemente è stato anche osservato che in alcune risposte di difesa della pianta le proteine PR vengono sintetizzate a seguito dell'induzione del metil jasmonato, una molecola segnale di natura lipidica.

1.5.7 Sintesi di fitoalessine

Le fitoalessine sono dei composti organici a basso peso molecolare con attività antimicrobica. Sono prodotte ed accumulate in elevate quantità nelle zone d' infezione (Paxton, 1981; Smith, 1996). Appartengono a gruppi chimici strutturalmente differenti, come i flavonoidi, le furanocumarine, i terpenoidi, gli stilbeni ed i poliacetileni. Esse sono prodotte dalle cellule sane vicine a quelle infettate o necrotizzate e si accumulano sia nei tessuti di piante resistenti che in quelli suscettibili. Tuttavia, nei tessuti delle piante resistenti, le fitoalessine vengono accumulate più velocemente e raggiungono concentrazioni più elevate capaci di arrestare l'ulteriore sviluppo del patogeno. La maggior parte delle fitoalessine, sono prodotte in risposta ad un attacco fungino ma ve ne sono anche prodotte contro batteri, virus, nematodi.

La produzione di fitoalessine è un meccanismo comune di resistenza ai patogeni in una vasta gamma di piante sebbene, piante diverse, utilizzino differenti tipi di metaboliti secondari come fitoalessine. Per esempio gli isoflavonoidi sono delle fitoalessine comuni nella famiglia delle leguminose, mentre nelle Solanaceae come il tabacco e il pomodoro, vengono prodotti come fitoalessine vari sesquiterpeni.

Le fitoalessine non sono di solito rilevabili nella pianta prima dell'infezione, ma sono sintetizzate rapidamente a seguito dell'attacco del patogeno mediante l'attivazione di nuove vie biosintetiche. I precursori delle fitoalessine sono molecole del metabolismo primario processate mediante meccanismi di regolazione molto complessi. Un esempio di questa efficiente regolazione è fornito dalla via biosintetica dei fenilpropanoidi , che porta alla sintesi di flavonoidi, furanocumarine e stilbeni e che partecipa anche alla formazione dei precursori della sintesi della lignina e della suberina utilizzate per il rafforzamento della parete cellulare in seguito ad infezioni. Molti enzimi implicati in questa via, sono attivati mediante sintesi *de novo* in risposta a vari tipi di stress. Inoltre, di recente, l'analisi della sequenza di alcuni dei geni codificanti questi enzimi, ha evidenziato la presenza di elementi comuni nelle sequenze delle regioni regolative, indicando, probabilmente, la necessità di meccanismi di regolazione comuni e coordinati (Dixon and Paiva, 1995).

1.5.8 Modificazioni della parete cellulare vegetale

E' stato dimostrato che la parete cellulare subisce cambiamenti strutturali in risposta al tentativo di penetrazione da parte del microrganismo. Queste modificazioni riguardano sia i costituenti polisaccaridici che non-polisaccaridici della parete cellulare e comprendono: deposizione di lignina, accumulo di glicoproteine ricche in idrossiprolina (tra cui l'estensina), deposizione di callosio e aggiunta di cutina o suberina.

Oltre a questi cambiamenti strutturali, nella parete sono presenti delle proteine in grado di contrastare l'attività degli enzimi idrolitici secreti dai microrganismi fitopatogeni durante il loro tentativo di penetrazione del tessuto ospite. Tra questi l'inibitore proteico della poligalatturonasi (PGIP) riveste una particolare importanza in quanto è in grado di inibire (e modulare) l'attività delle endopoligalatturonasi (endo-PG) di funghi patogeni.

1.6 La struttura della parete cellulare vegetale

Le cellule vegetali sono circondate da una parete cellulare relativamente sottile, ma capace di una notevole forza meccanica e destiata a sostenere la spinta osmotica cellulare (turgore) ma

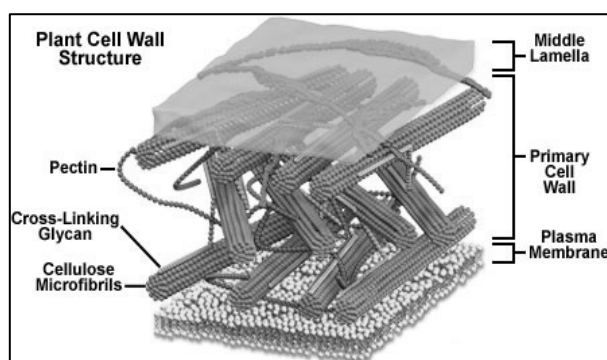


Fig.4 Struttura della parete cellulare tratta da micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html

anche a sostenere la pianta intera (effetto statico). La parete cellulare vegetale oltre alle funzioni elencate ha il compito di prevenire la diffusione dell'acqua e degli ioni dell'ambiente verso la membrana plasmatica, regola il volume cellulare, determina la forma della cellula e rappresenta una barriera di difesa contro agenti esterni sia di natura biotica che abiotica. La parete cellulare è una struttura

dinamica che è soggetta a notevoli cambiamenti fisico-chimici durante la crescita e contiene delle molecole che una volta rilasciate possiedono potenziali effetti fisiologici.

Le cellule in attiva crescita sono dotate di pareti cellulari che vengono dette primarie. Nelle cellule che hanno interrotto la crescita e che di solito hanno funzioni di sostegno o di trasporto, la parete primaria non ha più bisogno di espandersi e viene mantenuta inalterata oppure, più frequentemente, viene prodotta una parete cellulare secondaria tra la parete primaria e la membrana plasmatica (Hall et al., 1981).

La parete primaria è costituita da due fasi, una fase microfibrillare cristallina inclusa in una matrice amorfa non cristallina. La porzione microfibrillare è costituita da cellulosa organizzata in microfibrille mentre la componente di matrice è costituita da emicellulose e pectine. Tutte queste componenti sono legate tra loro da una combinazione di legami covalenti e non, che

consentono la formazione di una struttura la cui composizione specifica dipende dal tipo cellulare (Fig.4).

Una microfibrilla è il risultato dell'assemblaggio di 30-100 lunghi filamenti di cellulosa allineati in parallelo. La molecola di cellulosa è un α (1 $\rightarrow$ 4) glucano non ramificato. Le catene di cellulosa vengono stabilizzate da legami idrogeno intra-molecolari tra l'atomo di ossigeno dell'anello di un monomero di glucosio e l'atomo di idrogeno ossidrilico (-OH) del C₃ di glucosio adiacente all'interno della stessa catena. Inoltre i legami tra l'idrogeno di un -OH e l'ossigeno dell'-OH di un'altra catena, stabilizzano la struttura della microfibrilla. Le microfibrille di cellulosa sono di lunghezza indeterminata e variano in spessore e nel grado d'ordine. Il modello più accreditato per spiegare la precisa organizzazione molecolare della microfibrilla, suggerisce che si tratti di una struttura formata da domini cristallini legati insieme a regioni meno organizzate. All'interno dei domini cristallini vi sono dei glucani adiacenti disposti in modo ordinato e legati gli uni agli altri da legami di natura non covalente. E' proprio l'esteso legame fra glucani adiacenti all'interno di una microfibrilla di cellulosa che conferisce a tale struttura importantissime proprietà tra cui l'elevata forza di tensione, la resistenza alla degradazione chimica o enzimatica e la stabilità chimica.

La fase di matrice è più complessa dal punto di vista chimico e consiste in una varietà di polisaccaridi, proteine e composti fenolici. Le emicellulose sono un gruppo eterogeneo di polisaccaridi ramificati legati mediante legami idrogeno alla microfibrilla di cellulosa. Ci sono diversi tipi di emicellulose: xiloglucani, glucurono-arabinosilani e β -D -glucani a legami misti. Lo xiloglucano è formato da catene lineari di β -D-glucosio uniti da legami glicosidici α 1 $\rightarrow$ 4, che però, a differenza della cellulosa presenta delle catene laterali che prevengono l'assemblaggio dello xiloglucano in una microfibrilla cristallina. I glucurono-arabinosilani sono catene lineari (1 $\rightarrow$ 4) β -D-xilosio con singole unità di arabinosio; infine, i β -D -glucani a legami misti, sono degli omopolimeri non ramificati contenenti una miscela di oligomeri lineari di (1 $\rightarrow$ 4) di β -D -glucosio, collegati da singole unità di (1 $\rightarrow$ 3) β -D-glucosio.

Questa rete di microfibrille di cellulosa e molecole di emicellulosa si integra con un'altra rete di polisaccaridi intrecciati formata da pectine.

Le pectine sono fra i polimeri più complessi che si conoscano e si ritiene che abbiano diverse funzioni tra cui la determinazione delle caratteristiche di porosità della parete cellulare, fornire delle superfici cariche che modulano il pH di parete e, infine, servire da molecole di riconoscimento che segnalino le risposte appropriate nei confronti di organismi simbiotici, patogeni o insetti. Le pectine possono essere costituite da zuccheri acidi come l'acido galatturonico e zuccheri neutri come ramnosio, galattosio ed arabinosio. Le pectine più diffuse sono: ramnogalatturonano I, l'acido poligalatturonico, arabinani e arabinogalattano I. Alcune di queste pectine hanno una struttura relativamente semplice altre estremamente complessa. Ad

esempio l'acido poligalatturonico è un polimero lineare di acido α -D-galatturonico con legame $\alpha 1 \rightarrow 4$, che può contenere dei residui ramnosilici che creano un attorcigliamento nella catena. Un esempio noto di pectina altamente complessa è fornito dal ramnagalatturonano. Il formato da dieci zuccheri differenti legati in maniera molto complessa.

Le proteine presenti nella parete cellulare sono delle glicoproteine e vengono classificate sulla base della loro composizione amminoacidica in: glicoproteine ricche in idrossiprolina (HRGP), proteine ricche in glicina (GRP) e proteine ricche in prolina (PRP). La quantità di queste proteine varia a seconda del tipo cellulare. Oltre a queste proteine strutturali le pareti contengono anche le proteine arabinogalattaniche che sono altamente glicosilate e si pensa possano aver un ruolo nella via di segnalazione durante il differenziamento.

1.7 Enzimi implicati nella degradazione della parete cellulare

La maggior parte dei funghi e dei batteri fitopatogeni, produce degli enzimi in grado di depolimerizzare i polisaccaridi che compongono la parete cellulare delle piante (Cooper, 1984). Molti di questi enzimi sono glicoproteine extracellulari. Vi sono numerose evidenze che correlano questi enzimi degradativi con i sintomi della malattia (Cooper, 1997; Hahn et al, 1989).

Tra questi enzimi, i più importanti sono: le cellulasi, le xilanasi e gli enzimi pectici (Jones, et al, 1972).

Gli enzimi pectici sono in grado di attaccare la frazione pectica della parete cellulare, determinando la degradazione del tessuto e favorendo il rilascio di nutrienti utilizzati dal patogeno durante la crescita (Keen, 1992).

Le Poligalatturonasi (PG) fanno parte delle pectinasi che comprendono inoltre anche le pectin-metil-esterasi (PME) che rimuovono il gruppo metossilico, e le Pectine liasi (PL) che tagliano i ponti glicosidici di polimeri altamente esterificati mediante l'eliminazione di un gruppo β .

Gli enzimi pectici presentano un elevato polimorfismo (Cervone et al, 1986) le cui basi molecolari sono state chiarite solo per pochi di essi, quali le endopoligalatturonasi dei funghi patogeni *Fusarium moniliforme* (Caprari et al, 1993), *Aspergillus niger* (Bussink et al, 1992) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet et al, 1995). In tali funghi inoltre è stata riscontrata la presenza di isoforme multiple. Si è ipotizzato che la numerosità delle isoforme possa permettere al patogeno di degradare la parete di ospiti diversi in differenti condizioni ambientali.

Tra gli enzimi pectici, le endopoligalatturonasi rivestono un ruolo di primaria importanza in quanto sono enzimi precocemente secreti durante il processo d'infezione, e, la loro azione è necessaria affinché altre pectinasi possano agire.

La struttura degli enzimi pectici di alcuni patogeni come tre PGs di *Erwinia carotovora* (Pickersgill et al., 1998), *A. niger* (van Santen et al., 1999) e *F. moniliforme* (Federici et al., 2001) è stata chiarita recentemente mediante cristallografia a raggi x.

Le endopoligalatturonasi idrolizzano l'omogalatturonano della parete cellulare ad acido mono-, di- e, in alcuni casi, tri- galatturonico, causando, così, la macerazione dei tessuti vegetali, e la conseguente colonizzazione fungina (Cervone et al, 1987; Hahn et al., 1989; De Lorenzo et al, 1994).

I geni che codificano le PG sono organizzati in famiglie i membri delle quali mostrano un elevato grado di polimorfismo (Annis et al 1997, Marckovic et al 2001).

Le endopoligalatturonasi esibiscono una grande varietà di forme isoenzimatiche (Cervone et al, 1986, Favaron 2001) che differiscono in termini di stabilità, di pH ottimale, di attività specifica, substrato, cinetica di denaturazione e tipi di oligosaccaridi rilasciati.

L'importanza delle pectinasi nella patogenesi è stato recentemente dimostrato osservando che l'inattivazione di due geni *Pg* riduce la patogenicità di *Claviceps purpurea* ostacolando l'infezione di tessuti fiorali di *Secale cereale* (Oeser et al 2002). Questo è risultato essere particolarmente interessante poichè le pareti delle cellule vegetali delle monocotiledoni sono più povere in contenuto di pectine e il ruolo degli enzimi pectici nella patogenesi sembrava rivestire una minore importanza (D'Ovidio et al 2004).

Le endopoligalatturonasi, inoltre, differiscono anche per il meccanismo e la capacità di indurre le risposte nelle piante. Infatti, le endopoligalatturonasi fungine si comportano, generalmente, come elicitori attivando le risposte di difesa, in differenti specie di piante e in differenti cultivar, come l'accumulo di fitoalessine (Walker-Simmons et al,1992), sintesi di lignina (Bruce et al, 1989; Robertson, 1986) etilene, inibitori di proteasi e α -1,3-glucanasi(DeLorenzo et al. 1997, Anni et al. 1997, Lang et al.,2000).

Molti dati indicano però, che le endopoligalatturonasi fungine non sono direttamente responsabili dell'induzione delle risposte di difesa, ma, che a determinarla siano piuttosto i frammenti pectici o oligogalatturonidi rilasciati dall'azione di tali enzimi (Cervone et al, 1989). E' stato osservato infatti, che gli oligogalatturonidi con un grado di polimerizzazione compreso tra 10 e 15 sono in grado di fungere da elicitori della risposta di difesa della pianta.

Utilizzando una sospensione di cellule di soia, è stato dimostrato che gli oligogalatturonidi sono rapidamente internalizzati attraverso una rapida endocitosi mediata da recettore (Horn et al, 1989); essi inducono, entro 5 minuti, un aumento transiente dell'afflusso citoplasmatico di Ca^{2+} e di K^+ , una acidificazione citoplasmatica e depolarizzazione della membrana citoplasmatica nelle cellule di tabacco (Mathieu et al, 1991). Tuttavia, questa classe di oligogalatturonidi attivi viene idrolizzata rapidamente dall'azione della poligalatturonasi a frammenti più piccoli che perdono la capacità elicitante. (Hahn et al, 1989; De Lorenzo et al, 1994).

Dalle considerazioni fatte risulta chiaro come questi enzimi possono fungere da fattori di patogenicità in quanto permettono l'instaurarsi dell'infezione ed il suo successivo sviluppo, ma sono anche importanti in quanto possono determinare l'induzione della risposta di difesa da parte della pianta come l'attivazione delle vie di produzione delle fitoalessine e di geni coinvolti nella sintesi di jasmonato (Ridley et al 2001, Klarzynski et al. 2000).

Le poligalatturonasi sono presenti anche come geni endogeni nelle piante, dove svolgono un ruolo importante nell'ammorbidimento dei frutti durante la maturazione, dove provocano il deterioramento del tessuto depolimerizzando la pectina nella parete cellulare (Hadfield and Bennet 1998). Esse sono anche importanti nella distensione cellulare, nella germinazione del tubetto pollinico e nel processo di caduta delle foglie (Taiz e Geiger, 1996).

1.8 L'inibitore proteico delle poligalatturonasi (PGIP)

Le PGIP sono delle glicoproteine, appartenenti alla superfamiglia dei geni LRR associate alla parete cellulare sia delle dicotiledoni che delle monocotiledoni (DeLorenzo et al., 2001). Le PGIP hanno una massa molecolare di circa 40KDa (DeLorenzo et al., 2001) ed è stato dimostrato che queste proteine posseggono la capacità di inibire l'attività delle endo-PG fungine. Inibendo l'attività macerante delle endo-PG, le PGIP contrastano la degradazione della parete cellulare rallentando il processo d'invasione e diminuiscono il rilascio di nutrienti necessari per la crescita dei funghi patogeni (De Lorenzo et al, 2001).

Inoltre, la formazione del complesso PG-PGIP *in vitro*, determina l'accumulo di oligogalatturonidi con grado di polimerizzazione compreso tra 10 e 15 che sono in grado di scatenare la risposta di difesa della pianta (Cervone et al, 1997; Ridley et al, 2001) (Fig.5).

Da quanto detto emerge che le PGIP esercitano un duplice ruolo nella difesa della pianta: una funzione diretta che rallenta la penetrazione del patogeno e, una funzione indiretta consistente nell'attivazione dei meccanismi di difesa.

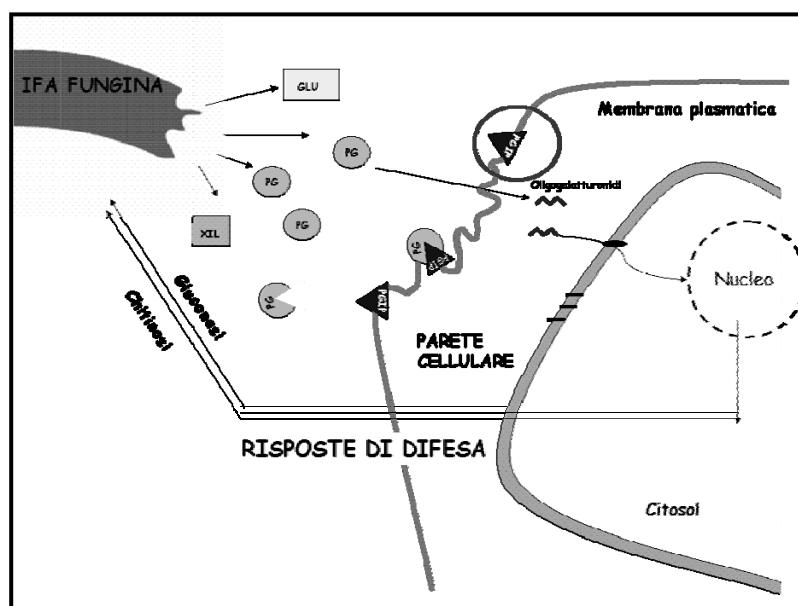


Fig.5 Meccanismo d'azione delle PGIP. Le PGIP svolgono un duplice ruolo nella difesa della pianta: una funzione diretta che tenta di bloccare la penetrazione del patogeno e, una funzione indiretta che consiste nell'attivazione dei meccanismi di difesa.

1.8.1 Le PGIP nel regno vegetale

Le piante hanno evoluto differenti PGIP caratterizzate da una determinata specificità di riconoscimento contro l'azione delle diverse PG prodotte dai funghi fitopatogeni. Le PGIP sono attive solo nei confronti delle poligalatturonasi fungine e non presentano alcuna attività inibitoria nei confronti di altri enzimi pectici sia di origine microbica che vegetale (Cervone et al., 1990).

Numerosi studi hanno fatto riscontrare, infatti, che PGIP provenienti da piante diverse presentano delle differenti specificità di riconoscimento nei confronti delle endo-PG fungine; inoltre è stato osservato che in una singola pianta possono essere presenti più PGIP e che queste possono differire nella loro specificità di riconoscimento nei confronti delle PG. Questo variabilità nello spettro di riconoscimento si manifesta sia come una maggiore o minore efficienza d'inibizione nei confronti delle diverse PG che come una incapacità di inibizione. Ad esempio, una PGIP purificata da pero è in grado di inibire completamente le attività delle PG di *Botritis cinerea*, *Aspergillus niger* e *Dithiorella gregaria*, inibisce leggermente le diverse PG prodotte dal *Penicillium expansum*, mentre non è in grado d'inibire la PG di *Fusarium oxysporum* (Abu-Goukh et al, 1983).

Mediante analisi biochimiche è stato possibile riscontrare che, come accennato sopra, l'attività totale PGIP osservata in estratti di alcune piante è data dall'insieme di differenti attività inibitorie dovute alla presenza di isoforme diverse di PGIP. Esempi di tale proprietà sono stati riscontrati in fagiolo (Desiderio et al, 1997), *Arabidopsis*, soia e frumento (Roberti,et al 2002). Quindi, l'ampio spettro di specificità PGIP che una determinata specie vegetale presenta, può dipendere dalla presenza di diverse proteine ciascuna delle quali contribuisce a determinare l'attività inibitoria complessiva riscontrabile in un estratto proteico grezzo.

Il primo gene codificante per una PGIP è stato isolato da *Phaseolus vulgaris* nel cui genoma è stata dimostrata un'organizzazione in famiglie geniche (De Lorenzo et al., 2001). La famiglia dei geni *pgip* in fagiolo risulta essere composta da quattro diversi membri situati sul cromosoma 10 (Frediani et al., 1993) e distribuiti in una regione di circa 50 kbp (D'Ovidio et al., 2004). Questi geni hanno una elevata identità di sequenza nella regione codificante mentre possiedono una evidente variabilità nelle regioni fiancheggianti 5' e 3' che si riflette nella loro diversa modalità di attivazione e regolazione (D'Ovidio et al., 2004). Le proteine codificate da questi geni presentano caratteristiche strutturali simili ma differenti specificità di riconoscimento contro le endo-PG fungine (D'Ovidio et al., 2004). Nel corso di queste analisi è stato anche dimostrato che la PGIP2 di fagiolo è la più efficiente, cioè quella col più ampio spettro di riconoscimento ed efficacia di inibizione, contro le PG fungine. Essa è risultata anche in grado

di inibire la PG di *Fusarium moniliforme*, una delle PG più resistenti all'inibizione della PGIP (Tabella 3).

Relativamente alle monocotiledoni, la PGIP è stata purificata in porro (Favaron et al., 1997), cipolla (Favaron et al., 1993) e recentemente in frumento (Kemp et al., 2003).

Nel caso del porro la sequenza N-terminale presenta una buona identità con le sequenze note di PGIP, mentre quella di frumento è completamente differente. Nel caso del frumento anche il profilo di specificità di interazione sembra essere peculiare in quanto, la proteina purificata mostra inibizione soltanto con la PG di *Cochliobolus sativus*, su un totale di nove PG analizzate (Kemp et al., 2003).

Tabella 3. Attività inibitoria delle 4 componenti la famiglia genica PGIP di fagiolo

Polygaracturonase	PvPGIP1	PvPGIP2	PvPGIP3	PvPGIP4
<i>Aspergillus niger</i>	140	1	∞	250
<i>Fusarium moniliforme</i>	∞	9	∞	∞
<i>Colletotricum gleosporioides</i>	16	12	230	1200
<i>Stenocarpella maydis</i>	7,5	5	260	60

ng di PGIP necessari per inibire del 50% l'attività della PG

1.8.2 La struttura della PGIP e relazione con altri prodotti genici LRR

La tipica struttura di una PGIP comprende un peptide segnale per la traslocazione nel reticolo endoplasmatico e un polipeptide maturo di 300-315 residui amminoacidici con diversi potenziali siti di glicosilazione. La maggior parte dei geni *pgip* non sono interrotti da introni, con l'eccezione dei geni di *Arabidopsis*, del lampone e di *Anthirrinum majus* in cui gli introni non solo sono presenti, ma la loro posizione viene anche conservata (Ramanathan et al., 1997).

La PGIP matura è caratterizzata dalla presenza di un dominio LRR, formato da 10 ripetizioni di circa 24 amminoacidi ciascuno, fiancheggiato dalle brevi regioni N- e C- terminali contenenti dei residui di cisteina, in posizioni conservate che presiedono alla formazione di ponti disolfuro necessari per la corretta configurazione terziaria della proteina.

Il motivo ripetuto ricco di leucine (LRR) è caratteristico della maggior parte delle proteine codificate dai geni di resistenza R, e contiene una sequenza consenso del tipo xxLxLxx.NxLx..GxIPxxLxxL.xxL (Di Matteo et al., 2003) dove G sta per glicina, I per isoleucina, L per leucina, N per asparagina, S per serina, T per treonina, P per prolina e x per un qualsiasi residuo amminoacidico. In ogni modulo LRR, vi è una sequenza consenso xxLxLxx, dove i residui di leucina formano un core idrofobico, mentre le catene amminoacidiche laterali, fiancheggianti le leucine, sono esposte al solvente ed interagiscono con il ligando (Di Matteo et al., 2003).

A conferma dell'importanza di tale regione, ed in particolare dei residui variabili, è stato dimostrato che anche una singola mutazione all'interno del motivo xxLxLxx determina un cambiamento di specificità di riconoscimento della proteina nei confronti di diverse PG. Infatti, sostituendo il residuo 224 di Q con uno di K, all'interno della xxLxLxx dell'ottavo modulo LRR, la PvPGIP2 di fagiolo perde la capacità di inibire la PG di *F. moniliforme* (Leckie et al., 1999). Analogo risultato è stato ottenuto caratterizzando una variante naturale di PvPGIP2 dal germoplasma di fagiolo contenente una delezione di 3 amminoacidi all'interno della xxLxLxx dell'ottavo modulo LRR, comprendente anche in questo caso la Q 224 (D'Ovidio et al., 2004). Come anticipato precedentemente, la regione LRR delle PGIP mostra una stretta relazione con la regione LRR dei geni di resistenza delle piante, come ad esempio il gene *Cf* di pomodoro (Jones et al., 1994) e il gene *Xa21* di riso (Wang et al., 1996). Questa somiglianza si estende a diversi recettori con attività chinasi coinvolti nello sviluppo di *Arabidopsis* (Gomez et al., 2000) ed anche a proteine animali. Relativamente a quest'ultimo aspetto, le PGIP presentano una grande analogia di struttura con una classe di proteine LRR animali extracitoplasmatiche chiamate SLRP (Small Leucine-rich Proteoglycans) e in particolare con una di loro chiamata decorina (Iozzo, 1999). Questa è una proteina solubile della matrice extracellulare che presenta una ripetizione di sei motivi ricchi di leucina fiancheggiati da ripetizioni di cisteina. La decorina interagisce con varie proteine della matrice coinvolte nel controllo della proliferazione cellulare e nella morfogenesi tissutale. Anche le PGIP, come la decorina, stabiliscono interazioni multiple con diversi ligandi; esse infatti legano non solo le PG fungine, ma anche le pectine della parete cellulare delle piante suggerendo il coinvolgimento delle PGIP nei processi di segnalazione dell'attacco patogeno.

1.8.3 Analisi strutturale dell'interazione PvPGIP2-PG fungine

La recente determinazione e comprensione della struttura cristallografica della PvPGIP2 (Di Matteo et al., 2003) ha permesso di chiarire meglio il modello di struttura che caratterizza anche altre proteine LRR in pianta (Van der Hoorn 2005).

La struttura della PvPGIP2 mostra la tipica forma delle proteine LRR anche se meno ricurva (Fig 6 A) (Di Matteo et al., 2003). Una caratteristica peculiare della PvPGIP2 di fagiolo è quella di possedere un foglietto β dove sono localizzati i residui che determinano l'affinità e la specificità della PvPGIP2 (Leckie et al., 1999), denominato B1, ed un addizionale foglietto β parallelo, denominato (B2), che è assente nella maggior parte delle altre proteine LRR, e che si pensa contribuisca alla formazione di un'ulteriore superficie di interazione (Di Matteo et al., 2003).

La PvPGIP2 è il più efficiente tra gli inibitori finora studiati (D'Ovidio et al 2004) e mostra differenti cinetiche inibitorie nei confronti di PG prodotte da funghi differenti. Per esempio la

PG prodotta da *F. moniliforme* (FmPG) (Federici et al 2001) viene inibita in modo competitivo mentre non lo è quella prodotta da *A. niger* (AnPG) (King et al 2002). Sono già stati dimostrati altri casi i cui la stessa PGIP mostrava inibizione competitiva e non competitiva a seconda della PG e questo fa pensare che probabilmente l'orientamento della PGIP nel complesso PG-PGIP può variare a seconda del ligando (Federici et al 2006).

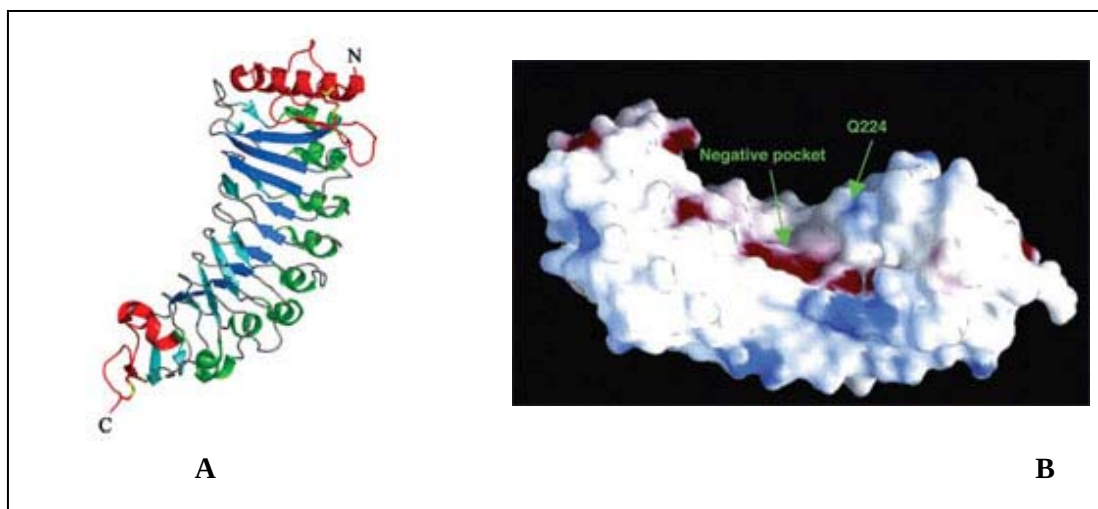


Fig.6 (A) Struttura cristallografica della PVPGIP2 tratta da Federici et al. 2006 Rappresentazione a nastro; **(B)**. Potenziale elettrostatico di superficie della PGIP2, è indicata la tasca negativa localizzata al centro del foglietto β (B1). è indicato inoltre l'aminoacido Q224 .

Allo scopo d'individuare quali fossero i punti critici per la formazione del complesso FmPG/PvPGIP2, nella PG di *Fusarium moniliforme* sono stati mutati diversi amminoacidi localizzati in prossimità di tale regione per analizzare il loro contributo nella formazione del complesso con la PvPGIP2. Da tali studi è stato possibile individuare nell'arginina-267 e nella lisina 269 del motivo gli amminoacidi coinvolti nell'interazione PG-PGIP. Questi due siti sono posti in prossimità del sito catalitico e potrebbero interagire con un gruppo di residui amminoacidici negativi, posti all'interno di una tasca negativa localizzata approssimativamente al centro del foglietto β (B1) della PGIP2. Si suppone che questa interazione venga stabilizzata, nell'interazione PGIP2-FmPG, da un residuo amminoacidico negativo (la glutammina-224) localizzato nel foglietto B1 immediatamente sotto la tasca negativa (Di Matteo et al., 2003) (Fig.6 B).

1.9 Le biotecnologie vegetali

Gli agricoltori hanno da sempre manipolato le piante da migliaia di anni con lo scopo di ottenere nelle piante coltivate dei caratteri nuovi non presenti in precedenza nella pianta, selezionandole poi fenotipicamente per il carattere di interesse. Tra questi, la resistenza agli stress biotici ha da sempre rappresentato un obiettivo di grande interesse.

1.9.1 Miglioramento genetico tradizionale

Le tecnologie convenzionali di miglioramento genetico sono basate su tecniche di incroci tra piante sessualmente compatibili.

Poiché però, insieme al tratto genetico di interesse, può essere introdotto anche una frazione importante di genoma con caratteri non desiderati, i breeders sono costretti a ricorrere a cicli successivi di re-incrocio per restringere la porzione non di interesse, allungando notevolmente i tempi necessari per l'ottenimento di nuove varietà.

1.9.2 Biotecnologie convenzionali

Le biotecnologie sono senz'altro uno degli ultimi strumenti che la tecnologia ha a disposizione per migliorare la ricerca in campo agricolo.

In modo coordinato con le metodologie di miglioramento tradizionali, le biotecnologie contribuiscono allo sviluppo di nuove tecniche in grado di alterare e controllare la crescita e lo sviluppo delle piante.

Uno dei campi di impiego delle biotecnologie consiste appunto nell'introduzione, integrazione ed espressione di geni esogeni nelle cellule vegetali. Da qui nasce il termine "trasformazione" che va inteso come l'introduzione di DNA nel genoma senza passare attraverso trasmissione sessuale.

Il DNA è prima incorporato in una singola cellula del genoma la quale, in condizioni selettive, viene moltiplicata per formare callo indifferenziato da cui può essere formata una pianta adulta mediante processi rigenerativi.

Quindi le biotecnologie, in associazione, col breeding tradizionale sono in grado di ridurre notevolmente i tempi necessari all'ottenimento di nuove varietà con caratteristiche aggiuntive.

Distinguiamo biotecnologie convenzionali e ingegneria genetica.

Tra le biotecnologie convenzionali, le tecniche maggiormente utilizzate sono la mutagenesi, la micropropagazione, la variabilità somaclonale, le colture di antere e la fusione di protoplasti.

1.9.3 Ingegneria genetica

Nell'ultimo decennio sono stati fatti passi avanti notevoli nell'ingegnerizzazione delle piante e la tecnologia del DNA ricombinante ha aperto nuove frontiere nel campo della trasformazione genetica delle piante coltivate.

Le metodologie utilizzate per il trasferimento dei geni utili sono i più vari e possono essere raggruppati in metodi che utilizzano trasferimento diretto via fisica, via chimica o mediante l'utilizzo di batteri naturali del suolo, i più utilizzati sono il bombardamento mediante metodo biolistico, la microiniezione, la trasformazione di protoplasti, l'elettroporazione ma due sono quelli maggiormente utilizzati: il bombardamento biolistico e l'infezione con *Agrobacterium*.

Metodo biolistico

Il metodo biolistico fu descritto per la prima volta da Sanford nel 1988. dove il propellente per lo sparo del DNA era costituito dalla polvere da sparo, ora sostituita da gas inerti quali l'elio o acqua elettro-vaporizzata in presenza di vuoto.

Il bombardamento mediante metodo biolistico fa uso di un processo fisico per arrivare alla trasformazione della pianta (Alpeter et al 2005).

La totale assenza di vincoli biologici, per lo meno fino al momento in cui il DNA viene integrato nel genoma, la rende una tecnica estremamente versatile ed efficiente; non ci sono limiti nella dimensione dei geni inseriti né nel numero di costrutti.

Lo svantaggio rispetto alla trasformazione mediata da *Agrobacterium* è la produzione di blocchi di transgeni contenenti frammenti del transgene riarrangiati o rotti. Ci sono anche evidenze di una maggiore instabilità e silenziamento a seguito dell'utilizzo di questa metodologia. Al momento il bombardamento biolistico è l'unica tecnica utilizzabile per produrre piante transgeniche da plastidi e mitocondri.

Infezione con *Agrobacterium tumefaciens*

L'altro metodo comunemente utilizzato è l'*Agrobacterium tumefaciens*, un batterio patogeno del suolo che infetta naturalmente le dicotiledoni causando la produzione di galle tumorali (Fig.7 A). L'*Agrobacterium* è in grado di trasferire una porzione specifica del suo DNA (T-DNA) con il plasmide Ti all'interno del nucleo delle cellule delle piante infettate dove viene stabilmente integrato nel genoma (Nester et al. 1984, c'è una review più aggiornata) (Fig.7 B). Il T-DNA contiene due tipi di geni: i geni oncogeni che codificano per enzimi coinvolti nella sintesi di auxine e citochinine responsabili della formazione del tumore; e quello per la sintesi delle opine. Quest'ultime sono sintetizzate e secrete dalle cellule delle galle e sono consumate dall'*Agrobacterium tumefaciens* come fonte di carbonio e di azoto, conferendo a quest'ultimo

un vantaggio sulla popolazione microbica. Il vantaggio nell'utilizzo di questa metodologia sta nel fatto che l'*Agrobacterium* inserisce normalmente il gene target in singola copia mentre con il metodo biobalistico si hanno inserzioni in multipla copia.

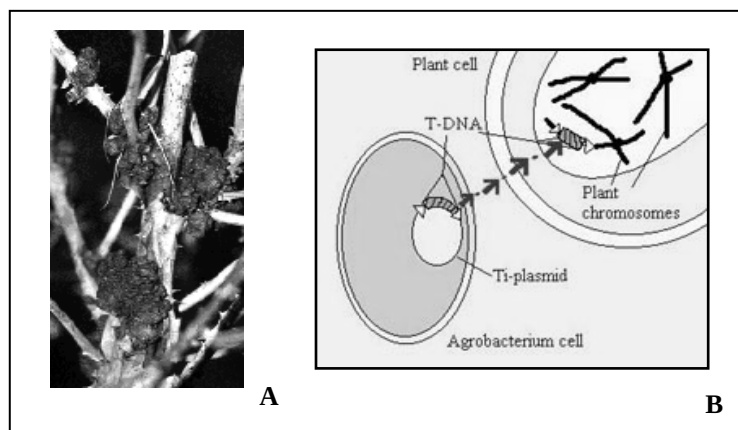


Fig.7 (A) Galla formata dall'infezione di *Agrobacterium tumefaciens*; **(B)** trasferimento del T-DNA nelle cellule vegetali. Foto tratte da www.nwcreation.net/genehijacking.html

1.10 Trasformazione genetica del frumento

Nell'ultimo decennio si sono fatti passi avanti notevoli riguardo la trasformazione dei cereali .

Le monocotiledoni erano inizialmente considerate specie difficili da trasformare poiché recalcitranti alla propagazione in vitro e a causa della loro resistenza all'infezione con *Agrobacterium*.

Inoltre il frumento tenero possiede, come detto in precedenza, un genoma esaploide molto complesso di $1,6 \times 10^{10}$ paia di basi, 5 volte la grandezza del genoma umano il che ha, ovviamente, interferito nell'utilizzo delle tecniche di DNA ricombinante.

I notevoli sforzi fatti nel migliorare le capacità rigenerative, nel trovare il metodo adatto per veicolare il DNA, e nel ridurre la dipendenza dal genotipo hanno portato alla stesura di protocolli per la trasformazione dei cereali, tra cui il grano, che hanno consentito non solo la produzione di piante resistenti ad erbicidi, ma anche la modificazione di caratteri qualitativi come la qualità della farina, o la creazione di piante resistenti a parassiti, funghi, o siccità, nonché allo sviluppo di genotipi maschiosterili.

Inoltre rispetto ad altri cereali come mais e riso, lo sviluppo di un sistema di rapida esecuzione in frumento è stato notevolmente rallentato dalla bassa efficienza di trasformazione e dalla scarsa ed instabile introgressione del transgene.

Le prime piante transgeniche di frumento sono state prodotte da Week et al., 1993 utilizzando il metodo biolistico. In seguito alla messa appunto di questi protocolli, moltissimi esperimenti

sono stati effettuati per ottenere piante geneticamente modificate di frumento in specifici caratteri (Tabella 4). Comunque la maggior parte delle pubblicazioni riportano la produzione di piante transgeniche esprimenti un unico transgene conferente tolleranza all'erbicida o resistenza a patogeni fungini, virali o batterici. (Pattnaik et al 2001, Repellin et al 2001).

Negli ultimi anni anche la metodologia del trasferimento mediante *Agrobacterium* ha fatto notevoli passi avanti dal primo esperimento condotto da Cheg et al 1997 ed alcuni dei risultati ottenuti sono stati recentemente riportati (Wir et al 2001, Khanna et al 2002, Jone set al 2005).

1.10.1 Scelta dell'espianto e coltura in vitro

La trasformazione genetica dei cereali ed in particolare del frumento dipende in larga misura dalla capacità dei tessuti trasformati di rigenerare su terreni di coltura idonei. In frumento sono essenzialmente due gli espianti utilizzati per la trasformazione : le infiorescenze immature e lo scutello di embrioni immaturi. In particolare la capacità degli embrioni immaturi di produrre con facilità callo embriogenico e quindi di rigenerare un numero elevato di piante, li ha resi l'espianto d'elezione per la trasformazione genetica del frumento.

In passato è stata testata anche l'efficienza di altri tessuti come meristemi apicali (Ahmad et al., 2002), foglie basali, (Wang and Wei, 2004), microspore (Folling and Olesen 2001, Ingram et al., 1999, Kunz et al., 2000; Liu et al., 2002) e semi maturi (Ozgen ert al 1998).

Le prime piante di frumento rigenerate furono ottenute da Shimada nel 1978, poi furono nel tempo ottimizzati vari fattori come l'età e la dimensione degli embrioni e la concentrazione di auxina necessaria per l'induzione del callo scoprendo che 10-18 giorni dopo l'antesi è il momento idoneo per avere un'alta frequenza di formazione di callo embriogenico e per avere un'elevata rigenerazione di germogli primari (Shimada e Yamada 1979, Pastori et al 2001, Weeks et al 2001).

Anche la dimensione dello scutello è un parametro chiave nella riuscita dell'esperimento di trasformazione, vari autori hanno paragonato l'efficienza di trasformazione stabilendo 0,5-1mm la dimensione idonea per l'espianto (Sears and Deckard 1982, Maddock et al., 1983, Rasco-Gaunt et al 2001). Nella maggior parte dei casi, inoltre, non si hanno trasformanti chimerici per via dell'origine monocellulare dell'embrione somatico (Ozias-Akins et al 1982, 1983).

Recentemente grande attenzione si è data al bombardamento effettuato su giovani infiorescenze di frumento duro (He and Lazzeri 1998, La macchia et al., 2001) e frumento tenero (Rasco - Gaunt and Barcelo 1999; Sparks et al., 2001) che hanno il grande vantaggio di essere semplici da prelevare e hanno mostrato una buona stabilità nella trasformazione sia con bombardamento che con *Agrobacterium*.

1.10.2 Metodo di trasferimento del DNA

Trasformazione genetica del frumento mediante bombardamento biolistico

Il metodo del bombardamento biolistico prevede, come accennato in precedenza l'assorbimento del costrutto plasmidico sulla superficie di particelle microscopiche di tungsteno od oro che vengono sparate ad elevata velocità sui calli embriogenesi.

Sono moltissimi i parametri da ottimizzare per la buona riuscita dell'esperimento e vanno dalle dimensioni dal tipo e dalla quantità di proiettile da utilizzare, dalla quantità di DNA plasmidico e dal metodo utilizzato per la precipitazione e, durante il bombardamento dalla forza del propellente, dalla pressione esercitata dall'elio e dalla distanza del tessuto target.

Tutti questi parametri influenzano l'efficienza della veicolazione del DNA e il grado di danneggiamento subito dai tessuti target e quindi la frequenza di trasformazione. La frequenza di trasformazione è stato oggetto di attenti studi poiché estremamente bassa nel caso di trasformazione di monocotiledoni. Pastori et al nel 2001 riportano varie prove effettuate utilizzando embrioni immaturi in differenti stadi di sviluppo e hanno trovato una correlazione tra l'efficienza di trasformazione e l'età della pianta donatrice; sono in questo modo riusciti a portare l'efficienza di trasformazione dallo 0,7 al 5% utilizzando espianti provenienti da giovani piante. Studi abbastanza recenti sono stati effettuati rendendo in considerazione differenti varietà di frumento ed hanno evidenziato che l'efficienza di trasformazione intra-varietale è del 4% (Rausco-Gaunt 2001).

Tabella 4: Piante transgeniche di frumento prodotte mediante metodo biolistico

Espianto utilizzato	Specie portatrice del gene target	Gene	Marker di selezione	Fenotipo	Bibliografia
IE	<i>Vitis vinifera</i>	Stilbene sintasi (VstI)	<i>pat</i>		Leckband et al., 1998
EC	<i>Hordeum vulgare</i>	Chitinasi classe II (<i>chiII</i>)	<i>bar</i>	Resistenza al fungo <i>E. graminis</i>	Bliffeld et al., 1999
IE	<i>O. sativa</i>	Thaumantine like protein (<i>tlp</i>), chitinasi (<i>chi11</i>)	<i>bar, pat</i>	Resistenza al fungo <i>F. graminearum</i>	Chen et al., 1999
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	Trypsin inhibitor	<i>bar</i>	Resistenza a <i>S. cerealella</i>	Alpeter et al., 1999
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	Chimeric stilbene sintasi (sts)	<i>bar</i>	produzione di fitoalessine	Fettig et al., 1999
IE	Virus del mosaico del frumento	Gene replicasi (Nib)	<i>bar</i>	Resistenza al virus del mosaico del frumento	Sivamani et al., 2000
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	RIP protein	<i>bar</i>	Resistenza ad <i>E. graminis</i>	Bieri et al., 2000
EC	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i> FsTri101	<i>bar</i>	Resistenza al fungo <i>F. graminearum</i>	Okubara et al., 2002
IE	<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>Aspergillus giganteus</i> antifungal protein	<i>bar</i>	Incrementa risposte difensive	Oldach et al., 2001
IE	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	Coat protein (Cp)	<i>bar</i>	n.d	Karunarante et al. 1996
IE	<i>T. aestivum</i>	Subunità gluteninica ad alto peso molecolare 1Ax1	<i>bar</i>	Accumulo della subunità gluteninica 1Ax1	Altpeter et al. 1996b
IE	<i>T. aestivum</i>	Subunità gluteninica ad alto peso molecolare chimerica	<i>bar</i>	Accumulo della subunità gluteninica chimerica Dy10:Dx5	Blechl & Anderson, 1996
IE	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Barnasi	<i>bar</i>	Maschiosterilità	Sivamani et al. 2000a
IE	<i>T. aestivum</i>	Subunità gluteninica ad alto peso molecolare 1Dx5	<i>bar</i>	Incremento caratteri qualitativi dell'impasto	Rooke et al. 1999
IE	<i>T. aestivum</i>	Subunità gluteninica ad alto peso molecolare 1Dx5 and 1Ax1	<i>bar</i>	Incremento caratteri qualitativi dell'impasto	He et al. 1999
IE	<i>T. aestivum</i>	Subunità gluteninica a basso peso molecolare	<i>bar</i>	Accumulo di subunità gluteniniche a basso peso molecolare	Masci et al. 2003
IE	<i>T. turgidum</i>	Subunità gluteninica Epitope -tagged a basso peso molecolare	<i>bar, uid</i>	Accumulo di subunità gluteniniche epitope-tagged a basso peso molecolare	Tosi et al. 2004

Abbreviazioni utilizzate: **CE** calli embriogenici; **EI** embrioni immaturi; *bar* e *pat* phosphotricina acetyl trasferase; *hpt* hygromycin phosphotransferase; *uid*

Per il presente lavoro di tesi è stato adottato il protocollo indicato da Weeks et al 1993 per il quale sono necessari 168 giorni per ottenere le prime piante transgeniche in antesi (Fig 8) ed utilizza espianti di embrioni immaturi con un diametro dello scutello che varia da 0,5-1 mm e che prevede un passaggio in un terreno al elevato potenziale osmotico ad elevato contenuto in saccarosio 4 ore prima del bombardamento. Risultati di studi a tale proposito indicano inoltre che uno shock osmotico prima del bombardamento, aiuta le cellule a superare meglio l'impatto del bombardamento. (Alpeter et al. 1996a; Blechl and Anderson 1996, Rasco-Gaunt et al. 1999).

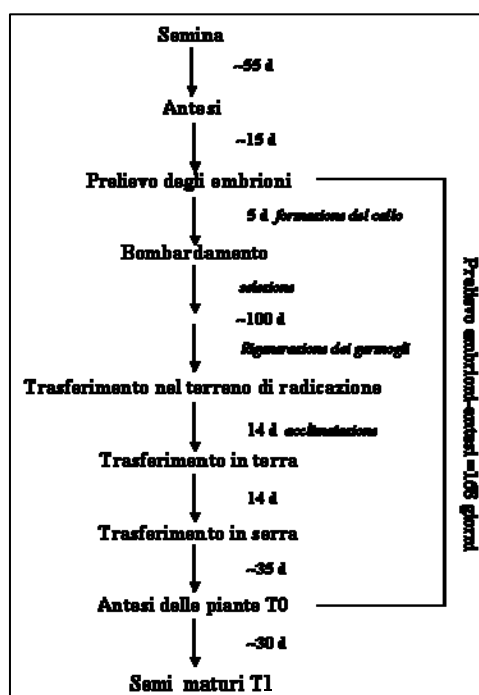


Fig 8. Schema riassuntivo dei passaggi in vitro necessari per l'ottenimento di piante transgeniche

Trasformazione del frumento mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Il metodo del bombardamento biolistico prevede, come accennato in precedenza l'assorbimento del costrutto plasmidico sulla superficie di particelle microscopiche di tungsteno od oro che vengono sparate ad elevata velocità sui calli embrionali.

Recenti lavori hanno inoltre riportato il confronto tra il numero di copie del transgene inserite nel caso del bombardamento biolistico e quello inserite con *Agrobacterium*. Secondo i dati riportati da Wu et al 2003, il 60% delle linee prodotte con *Agrobacterium* possiede il transgene in singola copia mentre con il bombardamento biolistico questa percentuale scende sotto il 10% (Shewry and Jones 2005).

Tabella.5 Elenco delle trasformazioni effettuate in frumento utilizzando *Agrobacterium tumefaciens*

Cv di frumento	Espianto	Ceppo di <i>Agrobacterium</i>	Efficienza di trasformazione	Bibliografia
BobWhite	EIPC, CE	C58	1,4-4,3	Cheng et al 1997
Fielder	EIPC	AGL0	1,8	Wu et al. 2001
Florida	EI	AGL1	0,3-3,3	Wu et al. 2003
Cadenza	EI	AGL1	2,5	Wu et al. 2003
Veery-5	EI	LBA4404	1,2-3,9	Khanna and Daggard 2003
BobWhite	EIPC, CE	C58	4,4	Hu et al. 2003
BobWhite	EIPC, CE	C58	4,8-19	Cheng et al. 2003
<i>Triticum durum</i>			3%	Vishnudasana et al 2005
BobWhite	EIPC	C58	0,5-1,5	Haliloglu and Baenziger 2003

Scelta del gene reporter e del marker di selezione

Per monitorare l'avvenuto inserimento del transgene si usa co-inserire un gene che può essere reporter se visivamente osservabile o di selezione.

La scelta del gene marcatore così come la scelta del promotore influenza notevolmente la riuscita dell'esperimento di trasformazione poiché la scelta del migliore gene marcatore consente una migliore selezione riducendo il numero di falsi positivi riscontrati. Il gene marcatore o reporter ha effetti visibili sul fenotipo delle piante transgeniche e quindi consente di rilevare l'espressione del DNA estraneo nei tessuti transgenici nei primissimi stadi di sviluppo e rigenerazione delle piante transgeniche.

Uno dei geni reporter più utilizzati per la sua peculiarità di essere facilmente visionabile è il gene *uidA* (Jefferson et al. 1987) che codifica per l'enzima β -glucuronidasi (GUS) che è istochimicamente rilevabile con la colorazione dei tessuti in blu laddove è presente l'espressione del gene (Vasil et al., 1992, 1993, Becker et al., 1994, Alpeter et al. 1996, Heyser et al., 1985, Barro et al., 2002).

Nonostante il reporter gene GUS sia stato negli anni il marcatore e più utilizzato una delle sue principali limitazioni consiste nella natura distruttiva del saggio di colorazione, di conseguenza negli ultimi anni si è preferito adottare marcatori che lasciano intatti i tessuti utilizzati. Tra questi possiamo ricordare quelli che codificano per la biosintesi di antocianine, la GFP (Green Fluorescent Protein) e la luciferasi (Mc Cormack et al., 1998, Lonsdale et al., 1990). Si è notata, inoltre, ridotta trasmissibilità del gene marcatore per la luciferasi nelle generazioni successive rispetto al marcatore GUS (Bourbon et al. 2002). Il gene per la luciferasi (*luc*) catalizza il substrato luciferina con l'emissione di luce gialla-verde facilmente rilevabile con un'immagine. La GFP è la più utilizzata come gene reporter perché consente un'elevata espressione nelle cellule vitali delle piante emettendo una fluorescenza verde standard

rilevabile mediante un microscopio a seguito di esposizione alla luce ultravioletta (Chalfie et al., 1994).

La GFP è stata largamente utilizzata negli ultimi anni come gene marcatore per la produzione di piante transgeniche di frumento come riportato in Tabella (Weir et al., 2001, McCormack et al., 1998, Pan et al., 1996, Jordan, 2000, Huber et al., 2002).

Al contrario dei geni reporter, i geni di selezione usati come marcatori per la trasformazione, consentendo l'espressione di un enzima che conferisce resistenza a sostanze citotossiche come gli erbicidi, permettono la sopravvivenza delle cellule trasformate su apposito terreno selettivo (Tab 6). I geni di selezione più utilizzati sono il gene *bar* (Thompson et al., 1987) che conferisce resistenza all'erbicida bialaphos e BASTA, *nptII* (Flavell et al. 1992), che conferisce resistenza all'antibiotico canamicina, *hpt* (Lonsdale et al 1990) che conferisce resistenza all'igromicina B.

Il *bar* è il gene più frequentemente utilizzato e codifica per l'enzima Pat (fosfinotricina acetiltrasferasi) che conferisce alla pianta la capacità di detossificare la fosfinotricina (PPT) il principio attivo dell'erbicida bialaphos e BASTA® (Hoechst, Germany).

Nonostante il largo utilizzo, il gene *bar* ha rivelato un'alta frequenza di falsi positivi.

Tabella 6: Marcatori di selezione comunemente usati per la trasformazione di frumento

Marcatore	Enzima codificato	Agente selezionante
<i>pat, bar</i>	Phosphinothricin acetyltransferase	Phosphinothricin,
<i>Hpt</i>	Hygromycin phosphotransferase	Hygromycin
<i>NptII</i>	Neomycin phosphotransferase II	Kanamycin, paromycin,
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	geneticin
<i>manA, pmi</i>	Mannose-6-phosphate isomerase	Glyphosate
<i>Cah</i>	Cyanamide hydratase	Mannose
GOX CP4	Glyphosate oxidoreductase enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase	Cyanamide
		Glyphosate

Scelta del promotore

Un punto critico della trasformazione è l'efficienza di espressione del gene target nei tessuti che dipende dal tipo di promotore scelto per preparare la cassetta genica.

Moltissimi promotori sono stati utilizzati per controllare l'espressione sia del gene target che del gene marcatore, tra questi il promotore dell'ubiquitina di mais (*ubi1*) con il suo primo introne, il promotore CaMV35S del virus del mosaico del cavolfiore, il promotore dell'actina di riso (*act1*), il promotore dell'alcol deidrogenasi di mais (*Adh1*), il promotore di un istone di mais (*H2B*), il promotore endosperma-specifico per le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMWG 1Dy10), ed altri elencati in tabella 7.

Tabella 7: Promotori utilizzati per trasformare in modo stabile il frumento

Promotore	Specificità	Modifiche	Origine
Ubiquitin (<i>Ubi1</i>)	Costitutivo	Include il primo introne	Rooke et al., (2000)
Actin (<i>Act1</i>)	Costitutivo	Include il primo introne	Riso
35S	Costitutivo		CaMV
35S-Sh ex/int	Costitutivo	esone e introne del mais shrunk	CaMV
35S-35S	Costitutivo		CaMV
35S-adh1	Costitutivo	introne del mais <i>adh1</i>	CaMV
35S-RTBV	Costitutivo	Introne del virus di riso tungro bacilliforme	CaMV
adh1/pEmu	Costitutivo	introne di mais <i>adh1e</i> AREs.Octopina sintasi	Mais
Histone H2B	Costitutivo	primo introne <i>Ubi</i>	Mais
Alcohol dehydrogenase	Costitutivo		Mais
Rice tungro bacilliform virus	Floema/ costitutivo		RTV
Granule-bound starch synthase	Endosperma e pericarpo		Grano
HMWG subunit 1Dy10	Endosperma		Blechl and Anderson 1996
Glutenine a basso peso molecolare(LMWG1D1)	Endosperma		Grano
Subunità HMWG (1Bx17)	Endosperma		Grano
Subunità HMWG	Endosperma		Grano
Glu-D1-1b (1Dx5) and A1-1a (1Ax1)		clone genomico	Grano
ADPglucose pyrophosphorylase	Endosperma, aleurone e sub aleurone	clone genomico più delezione serie 1391	Grano
Globulin G1b1	Endosperma		Mais
Amylase (<i>Amy1</i> and <i>Amy2</i>)	Aleurone/ scutello		Grano
Puindolines a and b	Endosperma		Grano
Lipid transfer protein (<i>Ltp</i>)	Aleurone		Grano
<i>vst1</i> , <i>vst2</i>	stress-inducibile		Vite
<i>Lem1</i>	organi fiorali in antesi		Orzo
<i>GstA1</i>	Epidermide specifico	Contiene un parte contenente un introne del gene WIR1 di grano	Grano

Tratti agronomici importanti

Come già accennato in precedenza, i recenti sviluppi nelle tecnologie applicate al frumento hanno portato alla produzione di piante transgeniche codificanti non solo per geni marcatori per la resistenza ad erbicidi ma anche per geni codificanti tratti agronomicamente importanti per l'incremento della qualità, maschio sterilità, resistenza alla siccità, ma soprattutto per la resistenza a patogeni di varia natura.

Per quanto riguarda la resistenza ai patogeni, il frumento risente particolarmente degli attacchi da parte dei patogeni fungina; infatti è riportato che il 5-10% delle perdite produttive riscontrate in questa coltura sono a carico dei patogeni di natura fungina. Quindi la maggior parte del

miglioramento genetico del frumento utilizzando tecniche di trasformazione genetica è indirizzato all'incremento della protezione nei confronti dei patogeni fungini (Tabella 5).

Gli approcci utilizzati dai ricercatori possono essere suddivisi in cinque categorie (Punja 2001) (Fig.8):

- 1) Espressione di prodotti genici che sono direttamente tossici per il patogeno o che riducono la crescita di quest'ultimo. Questi includono le PR (Pathogen related) come gli enzimi idrolitici (chitinasi e glucanasi), proteine antifungine (osmotine, thaumatine), peptici antimicrobici (tienine, defensine, lectine) e fitoalessine.
- 2) Espressione di geni R i cui prodotti sono coinvolti nelle reazioni ipersensibili o interazione con fattori di avirulenza.
- 3) Espressione di prodotti genici che distruggono o neutralizzano alcune delle molecole prodotte dal patogeno come le poligalatturonasi, l'acido ossalico e le lipasi.
- 4) Espressione di geni che rilasciano elicitatori di risposte difensive come perossido di idrogeno, acido salicilico, etilene.
- 5) Espressione di geni che potenziano le risposte difensive della pianta come elevati livelli di lignine e perossidasi.

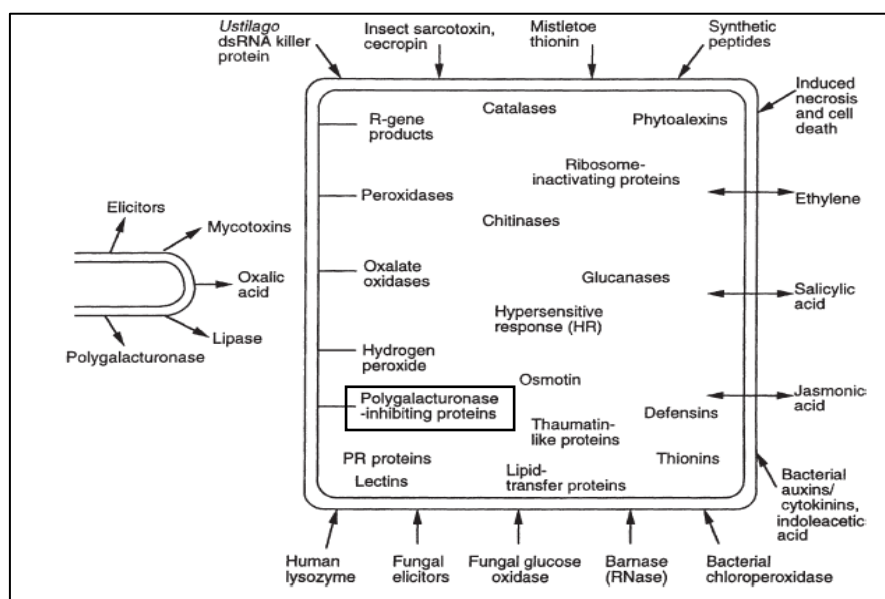


Fig.8 Le piante transgeniche sono state ingegnerizzate per sovra-esprimere proteine che contrastano i prodotti di virulenza prodotti dal fungo (ifa sulla sinistra), aumenta i prodotti di risposta di difesa della pianta (all'interno della cellula), e i prodotti derivanti da origini non interni alla cellula (all'esterno della cellula). Tratto da Punja 2001.

Tabella 8: Piante transgeniche di frumento prodotte per incrementare le risposte di difese della pianta.

Espianto utilizzato	Specie portatrice del gene target	Gene	Marker di selezione	Fenotipo	Bibliografia
IE	<i>Vitis vinifera</i>	Stilbene sintasi (VstI)	<i>pat</i>		Leckband et al., 1998
EC	<i>Hordeum vulgare</i>	Chitinasi classe II (<i>chiII</i>)	<i>bar</i>	Resistenza al fungo <i>E. graminis</i>	Bliffeld et al., 1999
IE	<i>Oryza sativa</i>	Thaumantane like protein (<i>tlp</i>), chitinasi (<i>chi11</i>)	<i>bar, pat</i>	Resistenza al fungo <i>F. graminearum</i>	Chen et al., 1999
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	Trypsin inhibitor	<i>bar</i>	Resistenza a <i>S. cerealella</i>	Alpeter et al., 1999
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	Chimeric stilbene sintasi (sts)	<i>bar</i>	produzione di fitoalessine	Fettig et al., 1999
IE	Virus del mosaico del frumento	Gene replicasi (Nib)	<i>bar</i>	Resistenza al virus del mosaico del frumento	Sivamani et al., 2000
IE	<i>Hordeum vulgare</i>	RIP protein	<i>bar</i>	Resistenza ad <i>E. graminis</i>	Bieri et al., 2000
EC	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i> FsTri101	<i>bar</i>	Resistenza al fungo <i>F. graminearum</i>	Okubara et al., 2002
IE	<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>Aspergillus giganteus</i> antifungal protein	<i>bar</i>	Incrementa risposte difensive	Oldach et al., 2001
IE	<i>Vitis vinifera</i>	Stilbene sintasi (VstI)	<i>uidA</i>	Incrementa risposte difensive verso <i>Puccinia recondita</i>	Serazetdinova et al., 2005
IE	<i>T. aestivum</i>	TaOXO (oxalato oxidasi)	<i>actin:bar</i>	Aumenta le risposte di difesa contro <i>Blumeria graminis</i>	Alpeter et al. 2005
IE	<i>T. aestivum</i>	TaPERO (perossidasi)	<i>actin:bar</i>	Non ha effetti nel migliorare la resistenza a <i>Blumeria graminis</i>	Alpeter et al. 2005
IE	<i>T. aestivum</i>	chitinasi classe VII e classe IV, glucanasi 289 e 638	<i>bar</i>	Ritardo nello sviluppo dei sintomi di <i>F. graminearum</i>	Anand et al 2003
IE	<i>Oryza sativa</i>	Thaumantane like protein (<i>tlp</i>)	<i>bar</i>	Non incrementa le risposte di difesa contro <i>F. graminearum</i>	Anand et al 2003

Abbreviazioni utilizzate: **CE** calli embriogenici; **EI** embrioni immaturi; **bar** e **pat** phosphothricina acetyl trasferase; **hpt** hygromycin phosphotransferase

1.11 Scheda fitopatologia di di due patologie fungine a carico del frumento

1.11.1 Maculatura bruna dei cereali

Agente Patogeno: f. asc. *Cochliobolus sativus* (Ito e Kurib.) Drech ex Dastur



Sintomatologia

Questa malattia colpisce tutti gli organi della pianta e sulla parte epigea gli esiti dell'attacco di elmintosporiosi sono rappresentati da macchie brunastre di forma ovale o irregolare, distribuite su tutta la lamina fogliare. Le spighe prodotte da piante malate si sviluppano regolarmente e sulle glume compaiono macchie bruno-rossastre. Alla base del culmo compaiono aree brunastre, più o meno ampie, ed i tessuti tendono progressivamente a marcire. Imbrunimenti e marcescenze si possono ritrovare anche a carico delle radici. Nel caso di attacco grave e precoci si può verificare al morte delle piantine nella fase di post-emergenza; più frequentemente le piante sopravvivono all'infezione e tendono a rimanere più basse e spezzarsi in corrispondenza dei nodi colpiti.

Fig 9. Sintomi iniziali dell'attacco di elmintosporiosi su foglia

Biologia ed epidemiologia



Responsabile di questa malattia è l'ascomicete *Cochliobolus sativus*, comunemente presente in antura nella sua forma imperfetta di *Helminthosporium sativum* (sin. *Drechslera sorokiniana*, *Bipolaris sorokiniana*). Questa specie fungina, diffusa un po' ovunque e della quale sono state ritrovate carie razze fisiologiche, è piuttosto polifaga, in grado di colpire diverse piante erbacee, soprattutto cereali, e causa danni di una certa gravità su orzo, grano e segale. Nel nostro paese le infezioni di elmintosporiosi non sono diffuse e pericolose. *Helminthosporium sativum* si ritrova spesso sul seme sul quale può essere responsabile della mancata germinazione e della produzione di germinelli deformati. Di norma questo fungo si conserva per molti anni nel terreno per poi manifestare la sua attività patogenetica inizialmente a carico delle radici o delle giovani plantule. Le infezioni secondarie sulle foglie e sul fuso sono provocate dai conidi che si producono sulla superficie degli organi malati, soprattutto durante i periodi caldo-umidi.

Fig 10. La sintomatologia sulla foglia si manifesta con la comparsa di macchie bruno rossastre sulle glume.



Fig.11 Conidi di *Bipolaris sorokiniana*

1.11.2 Fusariosi dei cereali

Agente patogeno : *Fusarium graminearum* (Smith) Sacc, *Fusarium culmorum* Schwabe, *Fusarium avenaceum* (Corda ex Fr.) Sacc, *Fusarium nivale* Ces. Ex Sacc.



Sintomatologia

Varie specie di *Fusarium* sono responsabili di differenti stati patologici che comprendono marciumi del seme, dei germinelli, del culmo e delle radici. Elemento fondamentale di questa malattia è la comparsa alla base del culmo e sulle spighe d un micelio fioccoso di colore bianco-rosato.

Dalle piante affette da fusariosi , a seguito del limitato trasporto di acqua ed elementi nutritivi lungo i vasi, si producono spighe sbiancate e striminzite per alcuni tratti e verdi in altri tratti con fiori in parte abortiti.

I primi sintomi di questa malattia si possono evidenziare già in fase di emergenza; in caso di inoculo presente sul seme la terminabilità è scarsa ed i germogli imbruniscono e deperiscono rapidamente.

I patogeni del genere *Fusarium* producono, in particolari condizioni climatiche, le tossine Zearalenone e Deossinivalenolo (DON).

Fig. 12. Sintomi su spiga



Biologia ed epidemiologia

Le principali specie di *Fusarium* che colpiscono i cereali sono : *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium nivale*. Nell'ambito di questi miceti risultano più diffuse nell'Italia meridionale le specie macroterme quali *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*. Le infezioni primarie prendono avvio dal micelio presente sulle cariossidi o dalle clamidospore e dal micelio che si trovano sui residui vegetali infetti.

La persistenza nel suolo di questi miceli è piuttosto lunga , grazie alla loro capacità di vivere allo stato saprofitario e di essere ospiti di svariate graminacee spontanee. La virulenza e la diffusione di questi patogeni dipende da vari fattori agronomici, colturali e ambientali; i maggiori attacchi si registrano in terreni abbondantemente concimati e negli impianti molto fitti.

Fig.13. Comparsa del micelio fioccoso e bianco alla base delle glume



Fig.14 Conidi di *Fusarium graminearum*

1.12 Scopo del lavoro

L'importanza della endo-PG come fattore di patogenicità e della PGIP come suo efficiente inibitore ci induce ad indagare l'efficacia della PGIP nel controllo delle malattie causate da alcuni funghi fitopatogeni. In particolare, dato il ruolo che le endo-PG sembrano svolgere nelle malattie che interessano gli organi riproduttivi delle graminacee, è di estremo interesse indagare il coinvolgimento delle PGIP nella difesa del frumento da alcuni funghi che attaccano la spiga quali: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *Microdochium nivale* e la *Claviceps purpurea*, per la quale l'importanza della PG nella patogenesi è stata già dimostrata. Inoltre la recente dimostrazione, che piante di pomodoro, *Arabidopsis* e vite sovraesprimenti la PGIP, mostrano un minor grado di colonizzazione ad opera del fungo patogeno *Botrytis cinerea*, indica l'efficacia della PGIP nel contrastare l'azione di patogeni fungini che producono PG durante le fasi di colonizzazione del tessuto ospite (Powell et al.; 2000; Ferrari et al.; 2003, Aguero et al 2005).

L'obiettivo del progetto della tesi di dottorato è quello di chiarire il ruolo della poligalatturonasi come fattore di patogenicità e della PGIP come fattore di difesa e quello di produrre piante transgeniche di frumento migliorate nella risposta di difesa verso tutti quei patogeni che producono la poligalatturonasi durante la fase di patogenesi.

Materiali e Metodi

2. MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione del costrutto pUBISR2

Il costrutto pUBISR2, contenente la *Pvpgip2* è stato preparato come descritto nella sezione dei risultati. Le reazioni di amplificazione sono state condotte con la Taq DNA polimerasi PWO della ROCHE nelle stesse modalità descritte nella sezione. I frammenti amplificati e il vettore di espressione sono stati sottoposti a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *Bam*HI; quindi vettore ed inserto corrispondente sono stati sottoposti ad una reazione di ligasi analogamente a quanto descritto sempre nella sezione materiali e metodi e successivamente 5µl di tale miscela sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche di *E.coli* DH5α.

2.2 Produzione di piante transgeniche

2.2.1 Terreni di coltura

I terreni di coltura sono terreni MS modificati per colture cellulari di frumento (Sears and Deckard, 1982). La preparazione implica l'aggiunta di Sali MS, Maltosio, Thiamina-HCl, L-asparagina, titolazione a pH 5.85 e successivamente aliquotata in bottiglie da 500 ml in cui è stato precedentemente aggiunto il phitagel.

Il terreno viene sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 120 C, si aggiunge il 2,4 D e viene versato in normali piastre Petri 100 mm x 15 mm, (tranne nel caso del terreno per il bombardamento per il quale le piastre Petri sono 60mm x 15 mm) e lasciato solidificare.

I terreni sono preparati secondo la metodologia e la composizione indicati da Weeks et al 1993 (Tabella 9).

Tabella 9:Composizione dei terreni di coltura e rigenerazione dei tessuti

Terreno per il prelievo degli embrioni	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt; • L-asparagine 0.15g/l • 0.25% v/v di phitagel • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno di recupero	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/ • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt; • L-asparagine 0.15g/l • 0.25% v/v di phitagel • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno per il bombardamento (Bomb sucrose)	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • Sucrose 171.5 g/l • 2,4 D (0.5 mg/ml) 2ml/500 ml
Terreno di rigenerazione	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • 2,4 D (0.5 mg/ml) 0.2ml/500 ml • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml
Terreno di radicazione	• Murashige & Skoog Salt mixture 2.15g/l; • Maltose 20g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 5ml/lt • L-asparagine 0.075g/l • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml
Terreno per la germinazione precoce	• Murashige & Skoog Salt mixture 4.3g/l; • Maltose 40g/l; • Thiamine-HCl (25mg/500ml) 10ml/lt • L-asparagine 0.15g/l • Bialaphos (1 mg/ml) 1.5 ml/500 ml

2.3 Espianti, bombardamento e rigenerazione delle piante

2.3.1 Isolamento degli embrioni

Cariossidi di 10-18 giorni dopo l'antesi sono state isolate da piante cresciute in serra allo stadio Zadoks 72 (Fig.15 A). Queste cariossidi sono state sterilizzate mediante sonicazione 6 volte per 20 secondi in etanolo al 70% contenente 50µl/100ml di tween 20. Successivamente sono state sterilizzate in etanolo 70% per 5 minuti, in ipoclorito di sodio al 20% per 15 minuti e risciacquate in acqua sterile tre volte per un minuto.

Gli embrioni immaturi della grandezza di circa 0.5-1 mm sono stati isolati mediante l'uso di stereomicroscopio e posizionati con la parte dello scutello esposta, sul terreno per il prelievo degli embrioni e conservati in cella di incubazione a 23 °C al buio per cinque giorni (Fig.15 B). Gli embrioni immaturi di 0,5-1 mm sono stati individuati come l'espianto che garantisce la più alta frequenza di trasformazione con il minor numero di trasformanti chimerici prodotti

2.3.2 Preparazione dei microproiettili e bombardamento

Al bombardamento precede la preparazione dei microproiettili di oro.

Una quantità pari a 30 mg di proiettili d'oro, di dimensioni di 0,6mm vengono pesati in una eppendorf da 1.5 ml (possibilmente siliconate in modo da evitare l'adesione delle particelle d'oro alle pareti) e risospesi in 500µl di etanolo 100% e aliquotati in eppendorf sterili da 35 µl ciascuna.

I microproiettili vengono microcentrifugati alla massima velocità per pochi secondi e l'etanolo viene rimosso. Successivamente i microproiettili vengono risospesi in 200µl di acqua sterile fredda, microcentrifugati nuovamente alla massima velocità per pochi secondi e il supernatante viene scartato.

Segue l'aggiunta del DNA plasmidico, nel caso specifico il costrutto pUBISR2 di 5719 bp, contenente il gene *Pvpgip2*, e il costrutto pUBI::BAR di 5505bp contenente il gene *bar* codificante per la fosfinotricina acetyl trasferasi, (PAT) che è in grado di disattivare la fosfinotricina, principio attivo di diversi erbicidi tra cui il bialaphos (Blechl e Anderson, 1996, Corneo et al. 1993). I due costrutti sono stati utilizzati per co-bombardare calli derivanti da embrioni maturi come descritto nel paragrafo precedente. Il rapporto molecolare tra i due plasmidi deve essere di 3:1 a favore del gene bersaglio.

Il quantitativo minimo di plasmide contenente il gene marcatore aggiunto è di 12.5 µg.

Quindi :

PUBISR2 (2.312 µg/µl)	37.5 µg	pari a	16.2 µl
UBI-BAR (3.229 µg/µl)	12.5 µg	pari a	3.87 µl

Segue l'aggiunta in ordine delle seguenti soluzioni:

Acqua sterile	224.93 µl
CaCl ₂ (2.5M)	250 µl
Spermidina	50 µl

I campioni così preparati vengono messi in agitazione su un vortex a una temperatura di 4 °C per 15-20 minuti e successivamente centrifugati per pochi secondi alla massima velocità. Il pellet viene risospeso in 600µl di etanolo 100% centrifugato alla massima velocità per pochi secondi e il supernatante viene eliminato. L'oro ricoperto dal DNA, così ottenuto, viene risospeso in 36 µl di etanolo 100% e conservato in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo.

Approssimativamente 30-40 calli, derivati da embrioni, vengono trasferiti nel terreno per il bombardamento ad alto potenziale osmotico 4 ore prima dell'inizio del bombardamento (Fig.15 C,D).

Successivamente 10 µl della soluzione contenente i microproiettili, accuratamente risospesa, viene posta sul disco del macrocarrier. Segue bombardamento come descritto da Weeks et al.1993 utilizzando l'apparato biolistico Dupont biolistic Delivery system (modello PDS-1000). La distanza del macrocarrier e del disco metallico dal tessuto bersaglio è di 13 cm e la resistenza del disco di rottura è 1100 psi (Fig.17).

Immediatamente dopo il bombardamento i calli vengono mantenuti nel terreno per il bombardamento e conservati al buio a 23 °C per 24 ore e successivamente trasferiti nel terreno di recupero per quattro settimane con trasferimento in terreno fresco ad intervalli di due settimane (Fig.15 E). Successivamente i calli vengono trasferiti nel terreno per la rigenerazione, caratterizzato dalla presenza dell'erbicida Bialaphos, dove rimangono per 6 settimane con trasferimento in terreno fresco ad intervalli di due settimane (Fig.15 F) in una camera di crescita e soggette a 16/8 ore di fotoperiodo (43 µE/m²) a 27 °C.

In questa fase nuovi germogli vengono emessi dai calli che risultano essere resistenti all'erbicida, solitamente a partire dalla terza settimana.

I germogli differenziati vengono trasferiti in tubi in pirex contenenti il terreno di radicazione, caratterizzato dall'assenza di 2,4 D, dove vengono sottoposti all'ultima fase della selezione.(Fig.15 H) e dove rimangono per un periodo variabile tra due-tre settimane.

Circa l'1% dei germogli sarà in grado di formare radici. A questo livello le piantine vengono definite "resistenti" se sono in grado di formare lunghe radici con fitti peli radicali in un terreno contenente Bialaphos (Fig. 15 G.1).

Le piante suscettibili all'erbicida, e pertanto non contenenti il gene marcatore, iniziano a formare abbozzi radicali ma le radici primarie interrompono la crescita e vengono emessi corti abbozzi di radici secondarie; la lamina fogliare presenta segni di necrosi fogliare e un ridotto vigore già dopo una settimana di coltura nel terreno di radicazione (Fig.15 G.2).

Una volta che le piante hanno raggiunto un'espansione della lamina fogliare e delle radici sufficiente(Fig. 15 H), vengono trasferite in vasetti e mantenute in camera di incubazione per

l'acclimatamento completamente coperte da un film plastico trasparente per aumentare l'umidità alla temperatura di 23 °C e con fotoperiodo di 16 ore per un periodo variabile tra cinque e dieci giorni (Fig.16 A).

Le piantine, denominate T0 (Trasformanti 0), sono pronte per essere trasferite nella serra dove verranno trapiantate in normali vasi (Fig.16 B).

Alcune delle linee avranno un normale livello di fertilità ma in generale quasi tutte le piante produrranno un numero inferiore di semi rispetto al controllo Bobwhite e alcune potranno risultare sterili.

L'intero processo a partire dall'isolamento degli embrioni immaturi fino all'ottenimento di cariossidi mature nelle piante T0 dura all'incirca 168 giorni. Non appena le piantine avranno emesso un numero sufficiente di foglie, verranno testate mediante PCR per l'effettiva presenza del transgene.

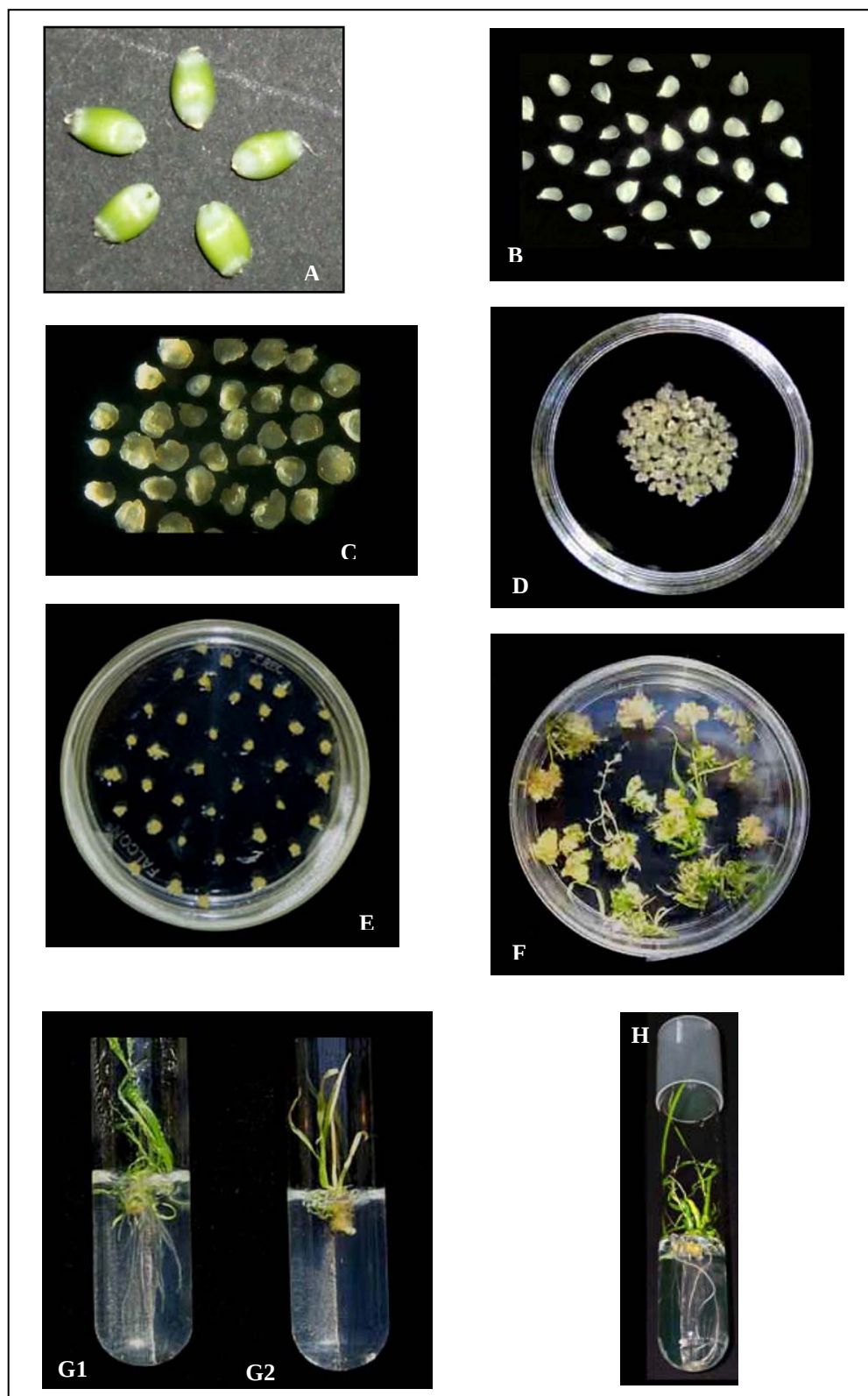


Fig 15. Fasi di subcultura e rigenerazione per l'ottenimento di piante transgeniche di frumento. (A) cariossidi di Bobwhite pronti per l'espanto (B) embrioni immaturi 0.5-1 mm di diametro (C): calli derivati da embrioni immaturi dopo cinque giorni di coltura; (D) calli in terreno per il bombardamento; (E) calli bombardati in terreno di recupero; (F) calli in terreno di rigenerazione; (G1) piantina resistente all'erbicida; (G2) piantina suscettibile all'erbicida; (H) piantina resistente in tubo in pirex contenente terreno di radicazione. Le immagini B e C sono tratte da Weeks et al 1993.

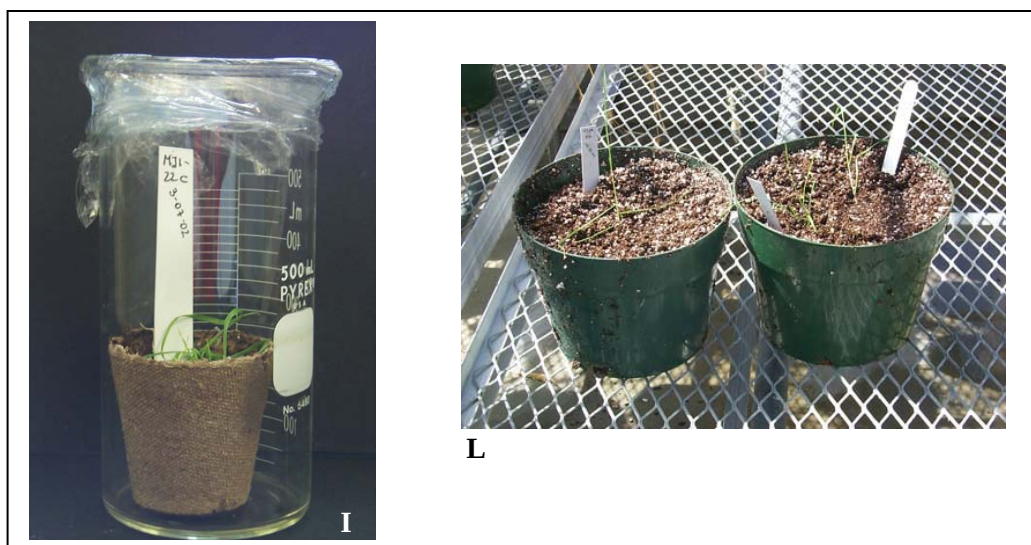


Fig.16 (A) piantine in vasetti; (B) piantine trapiantate in serra

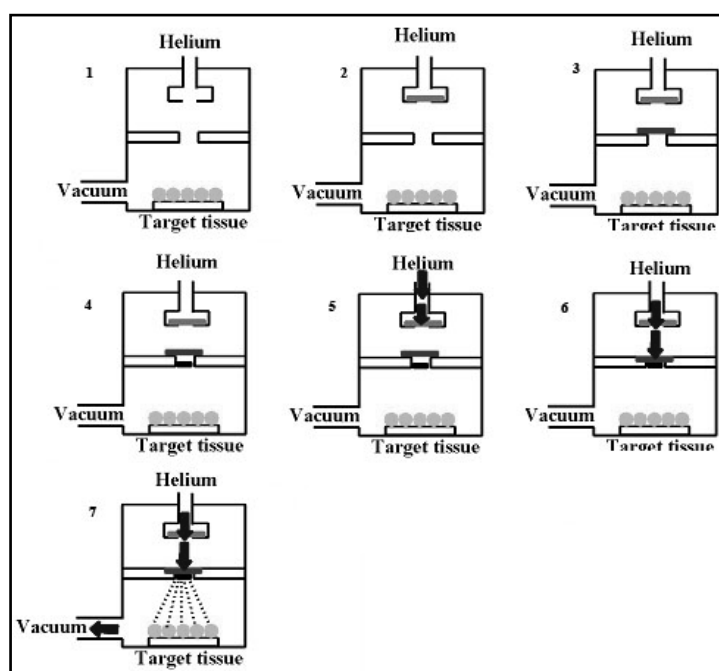


Fig. 17 Fasi del bombardamento con metodo biolistico utilizzando l'apparato BIORAD PDS1000/He. (1). il metodo biolistico utilizza entrambe pressione e vuoto. Esercitate rispettivamente dal gas elio e attraverso una pompa in una camera apposita; (2) Un disco di rottura (in viola) viene inserito vicino alla fonte di emissione dell'elio, lo spessore del disco di rottura decide la pressione necessaria per l'accelerazione delle particelle; (3) un disco di plastica (macrocarrier in rosso) viene posizionato dopo essere stato caricato di oro coperto di DNA, tra il disco di rottura e il tessuto bersaglio con la superficie rivestita di ora rivolta verso il basso; (4) un disco reticolato metallico viene posizionato sotto il macrocarrier; (5) Viene creato il vuoto e aperta la valvola dell'elio, l'elio trova la resistenza del disco di rottura con il risultato di accumulare pressione contro la superficie del disco di rottura; (6) una volta raggiunta la pressione massima il disco si rompe e l'elio viene rilasciato in pressione sul macrocarrier coperto di oro + DNA; (7) il microcarrier si sposta e a seguito dell'impatto contro il disco metallico, le particelle di oro si staccano in pressione e raggiungono in accelerazione il tessuto bersaglio contenuto nella piastra sottostante. Il vuoto bilancia l'onda d'urto esercitata dalla pressione.

2.4 Controllo e crescita delle piante transgeniche

Prima di essere messi a germinare i semi sono stati analizzati per verificare la presenza del transgene. Per far questo è stato estratto il DNA da mezza cariossidi e su di esso è stata condotta un'analisi PCR utilizzando gli oligonucleotidi specifici per il gene *Pvppgip2*.

Per l'estrazione di DNA da foglia è stata seguita la procedura riportata in D'Ovidio e Porceddu (1996). Un quantitativo di tessuto pari a circa un cm² di foglia è stato omogenizzato fino ad ottenere un omogenato molto sottile che è stato posto in una eppendorf a cui sono stati aggiunti 80 µl di tampone di estrazione (100mM Tris pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl) e 16 µl di SDS 20%. Il tutto è stato omogenizzato delicatamente e incubato a 65°C per 10 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 26,7 µl di acetato di potassio 5M e, dopo aver agitato delicatamente il campione è stato posto in ghiaccio per 20 minuti. Trascorso questo tempo il campione è stato centrifugato a 14000 RPM, il sopranatante contenente il DNA è stato recuperato e il DNA è stato precipitato mediante l'aggiunta di isopropanolo. Il pellet di DNA così ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, asciugato sotto vuoto e risospeso in 20 µl di TE. Un quantitativo di DNA pari a 1.5 µl è stato utilizzato per allestire le reazioni PCR. Queste reazioni sono state condotte utilizzando la miscela di reazione "RedTaq Master Mix" della Sigma utilizzando gli oligonucleotidi specifici per la sequenza *Pvpgip2* 615F/853R e le seguenti condizioni di amplificazione: 30 cicli composti dai seguenti step: 94°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto, più un ulteriore ciclo a 72°C per 5 minuti.

2.5 Estrazione degli acidi nucleici

2.5.1 Estrazione di DNA totale

Attraverso questa procedura è stato estratto tutto il DNA, sia nucleare che corpuscolare (Tai et al., 1990).

L'estrazione è stata effettuata partendo da tessuto fogliare verde, omogeneizzato con mortaio e pestello in presenza di azoto liquido. Ad ogni campione contenente circa 0.15 g di tessuto fogliare sono stati aggiunti 700 µl di tampone di estrazione (100 mM TrisHCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 1.25% SDS, 8.3 mM NaOH, 0.38% sodio bisolfito) pre-riscaldato a 65°C ed il campione è stato incubato in un bagnetto caldo a 65°C per 10 minuti, agitando di tanto in tanto. Sono stati aggiunti 0.22 ml di potassio acetato 5M ed il campione è stato posto in ghiaccio per almeno 40 minuti, poi è stato centrifugato a 4°C per 3 minuti e il sopranatante è stato filtrato con carta miraclot. Sono stati aggiunti 600 µl di isopropanolo e si è centrifugato di nuovo a 4°C per 3 minuti, eliminando poi il sopranatante e sciacquando il pellet due volte con 800 µl di etanolo al 70%.

Sono stati aggiunti al pellet 300 µl di T5E (50 mM Tris pH 8, 10, mM EDTA pH 8), il campione è stato vortexato e posto a 65°C per 5 minuti. Il campione è stato poi nuovamente vortexato per risospendere il pellet e sono stati aggiunti 150 µl di ammonio acetato 7.4 M, poi è stato centrifugato 3 minuti e al sopranatante sono stati aggiunti 330 µl di isopropanolo. Il campione è stato centrifugato 3 minuti e, dopo aver eliminato il sopranatante, il pellet è stato sciacquato due volte con etanolo al 70%. Sono stati aggiunti 100 µl di T5E ed è stato incubato a 65°C per 5 minuti.

Sono stati aggiunti 10 µl di sodio acetato 3M e 75 µl di isopropanolo, poi il campione è stato centrifugato 3 minuti, è stato eliminato il sopranatante ed è stato sciacquato due volte con etanolo al 70%. Il pellet è stato asciugato in savant per 15 minuti, poi è stato risospeso overnight a 4°C in 25 µl di TE. Il campione il giorno successivo è stato poi scaldato a 65°C per 5 minuti e conservato a -20°C.

2.5.2 Estrazione RNA totale

L'estrazione e la successiva manipolazione dell'RNA sono state effettuate utilizzando delle procedure di lavoro molto accurate, finalizzate a evitare il contatto con RNasi presenti in tutti i materiali biologici a tal fine ogni procedimento è stato eseguito con materiale utilizzato solo per RNA ed utilizzando guanti monouso. L'acqua è stata trattata o/n con dietil pirocarbonato (DEPC), un inibitore delle RNasi, e successivamente autoclavata per neutralizzare l'azione tossica di questo composto.

L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando il kit "RNeasy" della Qiagen a partire da un quantitativo di 100 mg di materiale fogliare congelato che è stato ridotto in polvere usando mortaio e pestello, in presenza di azoto liquido.

Alla polvere ottenuta sono stati aggiunti 450 µl del buffer RLT a cui erano stati precedentemente aggiunti 6,075 mg di ditiotreitolo (DTT). La sospensione è stata incubata a 56°C per 3 minuti per favorire la lisi dei tessuti. Il lisato è stato trasferito in una colonnina e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti in modo da rimuovere i detriti cellulari che vengono trattenuti dalla membrana posta all'interno della colonnina. Al lisato così purificato sono stati aggiunti 225 µl di etanolo al 100%. Tutto il volume è stato trasferito in una colonnina RNeasy contenente una membrana di silice alla quale aderiscono gli acidi nucleici. La soluzione di estrazione è stata centrifugata per 15 secondi a 10000 rpm. Il filtrato è stato eliminato e 700 µl di buffer RW1 sono stati aggiunti nella colonnina RNeasy, sulla cui membrana è rimasto adesso l'RNA. Il campione è stato centrifugato per 15 secondi a 10000 rpm per pulire la colonnina. La colonnina è stata trasferita in un nuovo tubo e vi sono stati aggiunti 500 µl di buffer RPE; il filtrato è stato eliminato tramite centrifugazione a 10000 rpm per 15 secondi. Questo passaggio è stato ripetuto per una seconda volta al fine di purificare l'RNA.

Per eluire l'RNA adeso alla membrana della colonnina sono stati utilizzati 50 µl di acqua priva di RNasi. L'RNA così estratto è stato conservato a -80°.

Per poter eliminare il DNA che inevitabilmente si co-purifica con l'RNA i campioni di RNA sono stati trattati con la DNasi I. L'eliminazione del DNA è stata effettuata utilizzando il kit "DNA-free" della Ambion.

2.5.3 Estrazione e purificazione DNA plasmidico

Dopo aver trasformato le cellule batteriche con un plasmide o con una miscela di ligazione, ed aver ottenuto da ogni cellula trasformata una colonia, si è proceduto all'estrazione. Ogni singola colonia batterica è stata utilizzata per inoculare 1,5 ml di terreno LB, contenente ampicillina ad una concentrazione pari a 100 µl /ml. Ogni coltura batterica è stata quindi incubata a 37°C in agitazione a 250 rpm o/n. Il giorno seguente, le colture batteriche sono state trasferite in tubi eppendorf e sono state centrifugate a 14000 rpm per 1 minuto, lavate con 1 ml di TE (Tris-HCl 1M pH 8; EDTA 1 mM) e centrifugate nuovamente come prima. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 150 µl di SET (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 50 mM pH 8; Saccarosio 20%) avendo molta cura di mescolare bene la soluzione utilizzando il vortex. Sono stati poi aggiunti 350 µl di miscela litica (NaOH 0,2 M; SDS 1%) e dopo aver mescolato delicatamente, si è lasciata la sospensione in ghiaccio per 10 minuti. Dopo aver aggiunto 250 µl di Na-acetato 3 M pH 4,8, la sospensione è stata mescolata delicatamente e lasciata in ghiaccio per 20 minuti in modo da permettere all'SDS e al DNA cromosomico di precipitare; quindi dopo una centrifugazione di 10 minuti a 14000 rpm, si è recuperato il supernatante (700-750 µl) ed è stato aggiunto un uguale volume di isopropanolo freddo, per far precipitare il DNA plasmidico. Dopo aver mescolato accuratamente la miscela, si è centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato quindi lavato con etanolo al 70% ed asciugato in pompa da vuoto per 10-15 minuti. Il pellet è stato poi risospeso in 20 µl di TE, e dopo aver aggiunto 1 µl di RNasi (1mg/ml), tale sospensione è stata incubata a 37°C per un minimo di 20 minuti. La resa media realizzata con questa procedura è stata di circa 3 µg per ogni 1,5 ml di coltura batterica.

2.5.4 Estrazione di Mediprep di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit Nucleobond PC100 dell'M-Medical seguendo la procedura indicata nel protocollo fornito

2.6. Metodo di analisi di acidi Nucleici

2.6.1 Elettroforesi su gel di agarosio

Per l'identificazione e la separazione dei frammenti di DNA è stata utilizzata l'elettroforesi su gel di agarosio. Le corse elettroforetiche standard sono state effettuate su gel di agarosio all'1,2% e all'1,5% in TBE 1× (Tris-borato-EDTA). Per facilitare la risoluzione dei frammenti, le corse sono state condotte ad un voltaggio massimo di 70-75V. I frammenti di DNA frazionati sono stati messi in evidenza immergendo il gel in una soluzione di bromuro d'etidio (0,5 µg/ml) per circa 15 minuti; questo, intercalandosi nella doppia elica del DNA lo rende visibile mediante irradiazione con raggi UV.

In alcuni casi il bromuro di etidio è stato aggiunto al TBE, alla stessa concentrazione, durante la preparazione del gel.

2.6.2 Elettroforesi su gel d'agarosio contenente formaldeide

Per verificare l'integrità dell'RNA estratto e uniformare il più possibile i quantitativi da usare nei successivi esperimenti, i campioni di RNA sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di formaldeide. Le corse elettroforetiche sono state effettuate utilizzando gel di formaldeide all'1,2% in tampone di corsa MOPS pH7. I campioni caricati sono stati preparati aggiungendo ad 1 µl di RNA 3 µl di acqua DEPC e 1 µl di Loading Buffer 6x. Dopo bollitura a 65°C per 5 minuti e raffreddamento in ghiaccio per 1 minuto, è stato aggiunto 1 µl di bromuro di etidio (100 µg/ml).

2.6.3 Estrazione e purificazione dei frammenti di DNA da gel di agarosio

I frammenti di DNA estratti dal gel di agarosio sono stati purificati utilizzando il kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification della Pharmacia-Amersham. La porzione di gel contenente il frammento di DNA da purificare, è stata tagliata con una lama da bisturi sterile e trasferita in un tubo eppendorf.

Dopo aver pesato la frazione di gel recuperata, sono stati aggiunti 10 µl dell'apposito tampone (Capture Buffer) per ogni 10 mg del frammento di gel. Il contenuto del tubo eppendorf è stato miscelato vigorosamente utilizzando il vortex e poi, al fine di far sciogliere il gel, è stato incubato a 60°C per 10-15 minuti.

Una volta sciolto, il campione è stato trasferito in una colonnina (GFX Column) posta su un Collection Tube (entrambi fanno parte del kit), ed è stato incubato a temperatura ambiente per 1 minuto e subito dopo centrifugato per 30 secondi a 14000 rpm, in modo da far adsorbire il DNA

alla membrana della colonnina. Quest'ultima è stata poi lavata con 500 µl di un apposito tampone (Wash Buffer), contenente etanolo, che è stato subito rimosso con una centrifugazione di 30 secondi a 14000 rpm.

Questa centrifugazione è stata ripetuta una seconda volta per rimuovere eventuali residui di etanolo presenti nel Wash Buffer. Il DNA è stato quindi eluito dalla colonnina mediante l'aggiunta di Tris-HCl 10 mM pH 8,0 seguita da incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e successiva centrifugazione per 1 minuto a 14000 rpm.

2.6.4 Digestione con enzimi di restrizione

Le digestioni del DNA plasmidico e genomico sono state effettuate utilizzando dai 500 ng ai 10 µg secondo lo scopo (semplice controllo dei ricombinanti o per un eventuale recupero da gel di agarosio). La soluzione di DNA è stata incubata per 1-2 ore a 37°C con 2-5 unità di enzima di restrizione, nelle specifiche condizioni di reazione, in modo da provocare dei tagli a livello di specifiche sequenze di DNA.

Le digestioni del DNA genomico sono state effettuate nel tampone di reazione appropriato utilizzando da 1 a 10 µg di DNA e 1 unità di enzima di restrizione per ogni µg di DNA in un volume finale adeguato (20-40 µl).

Tranne nei casi in cui il DNA è stato direttamente analizzato su gel di agarosio, le reazioni di digestione sono state bloccate utilizzando EDTA 0,5 M pH 7,5 alla concentrazione finale di 10 mM.

2.6.5. Southern blotting

Il metodo utilizzato è stato quello di Southern (Sambrook *et al*, 1989).

Dopo essere stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, ed essere stati fotografati, i frammenti di DNA sono stati trasferiti su filtro di nylon carico positivamente (Roche) secondo le seguenti modalità.

Il gel è stato posto in agitazione per 60 minuti in una soluzione denaturante contenente NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M. Questa soluzione denatura le molecole di DNA (da doppia a singola elica), rendendole disponibili per l'ibridazione con la sonda. Successivamente il gel è stato posto in agitazione in una soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M pH 8,0) per 60 minuti.

I frammenti di restrizione presenti nel gel così trattato sono stati sottoposti a trasferimento per capillarità utilizzando come tampone di trasferimento l'SSC 10× (NaCl 150 mM; citrato di sodio 15 mM). Alla fine del trasferimento (circa 16 ore) è stata prelevata la membrana che dopo essere stata lavata per 10 minuti con SSC 2×, è stata fatta asciugare all'aria per circa 30 minuti.

Il DNA trasferito è stato fissato mediante raggi UV a 150 Joule. In questo modo il filtro è pronto per l'ibridazione con la sonda marcata.

2.6.6. Ibridazioni molecolari

Questi esperimenti consistono di quattro fasi: preibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevamento immunologico.

Preibridazione

In questa fase le membrane su cui sono state trasferite le molecole di DNA, sono state saturate in modo da impedire alla sonda di legarsi sul filtro e generare del segnale di fondo (background).

La soluzione che è stata utilizzata ha la seguente composizione: SSC 5×; N-Laurilsarcosine 0,1%; SDS 0,2%; Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) 0,5%. La membrana è stata tenuta in preibridazione per almeno 3 ore alla temperatura di 65°C.

Ibridazione

La sonda è stata denaturata ponendola a 95°C per 5 minuti e quindi in ghiaccio per 1 minuto. In questo modo si rinaturano solo le sequenze altamente ripetute eventualmente presenti.

La sonda così trattata è stata mescolata ad una soluzione analoga a quella di preibridazione. Il filtro è stato mantenuto in tale soluzione per almeno 6 ore alla temperatura di 65°C per le ibridazioni ad alta stringenza o alla temperatura di 55-50°C per le ibridazioni a medio-bassa stringenza.

Alla fine di questa fase la sonda è stata recuperata e conservata a 4°C per essere riutilizzata altre volte.

Lavaggio

Il filtro è stato lavato due volte con una soluzione contenente SSC 2× e SDS 0,1% per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi due volte per 15 minuti alla temperatura di ibridazione con una soluzione contenente SSC 0,1× e SDS 0,1%.

In seguito i filtri sono stati sottoposti a rilevamento immunologico di due tipi: rilevamento colorimetrico e rilevamento per chemiluminescenza.

Entrambi consistono in una serie di passaggi che consentono di evidenziare i frammenti di DNA cui si è legata la sonda.

Rilevamento con metodo colorimetrico

Dopo aver lavato per 5 minuti i filtri con il tampone 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 150 mM), questi sono stati incubati a temperatura ambiente con il tampone 2 (buffer 1 + Blocking Reagent 0,5%) per 30 minuti. Si è poi proceduto ad aggiungere al tampone 2 l'anticorpo coniugato, alla concentrazione di 150 mU/ml e successivamente alla rimozione dell'anticorpo che non si è legato mediante due risciacqui con il tampone 1 per 15 minuti ed un risciacquo per 3 minuti con il tampone 3 (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM).

Infine, i filtri sono stati posti al buio in una "soluzione colorante" [tampone 3 + 2,25% di soluzione NBT (nitroblutetrazodio) 75 mg/ml + 1,75% di soluzione di X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) 50 mg/ml].

I frammenti di DNA che hanno ibridato si sono evidenziati in un tempo che è variato da pochi minuti a qualche ora. La reazione è stata bloccata immergendo i filtri in TE pH 8,0 per circa 10 minuti. Quindi i filtri sono stati fatti asciugare all'aria e sono stati conservati riposti fra due strati di carta bibula.

Rilevamento con metodo chemiluminescenza

Questo tipo di rilevamento differisce rispetto al metodo colorimetrico, oltre che per alcuni tamponi di lavaggio, per il substrato su cui va ad agire la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo, che non l'X-fosfato, ma il CSPD. Quest'ultimo, subendo una defosforilazione, emette luce che impressiona la lastra fotografica.

I tamponi e le modalità di lavaggio utilizzati sono: 5 minuti di lavaggio con tampone 1 (Acido Maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5; + 0,3% Tween 20 V/V), un secondo lavaggio con tampone 2 (10× blocking solution 1: 10 in Acido Maleico) per 30 minuti e successiva aggiunta dell'anticorpo antiDIG –AP fragment (Roche) utilizzato nel rapporto 1:10000. La rimozione dell'anticorpo è stata fatta con due risciacqui con tampone 1 di 15 minuti ciascuno e con un risciacquo con tampone 3, lo stesso utilizzato nel rilevamento colorimetrico.

Il filtro è stato messo in una busta di nylon, è stato aggiunto 1 ml di CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2 dioxetane-3,2'-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenil phosphate) ed è stato posto 15 minuti a 37°C per favorire la reazione con la fosfatasi alcalina. Infine, il filtro è stato esposto su lastre fotografiche e sviluppato dopo 3 ore e dopo esposizione over night.

2.6.7 Marcatura del clone pBS219 mediante PCR

La marcatura del clone è stata effettuata mediante reazioni di polimerizzazione a catena in presenza di digossigenina, secondo la procedura riportata da D'Ovidio e Anderson, 1994.

1 µl di DNA (15ng) è stato aggiunto ad una miscela di reazione contenente: 73,5 µl di H₂O; 10 µl di tampone 10×; 10mM dATP, dCTP, dGTP; 1mM dTTP; 0,1 mM DIG-11dUTP-alkali labile (Roche) 100 mM primers PvPGIP2 40F/ pvPGIP2 853R; 2,5 U di RedTaq Polymerasi (Sigma).

L'amplificazione del DNA è stata effettuata alle seguenti condizioni: 94°C per 1 minuto; 55°C per 1 minuti; 72°C per 1 minuti per un totale di 30 cicli.

Il DNA amplificato è stato successivamente purificato utilizzando il kit "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham-Pharmacia).

L'efficienza della marcatura viene controllata mediante il TEST STRIP (Roche).

La sonda è stata conservata a 4°C fino al momento dell'uso.

2.6.8 RT-PCR

L'RNA delle linee transgeniche è stato sottoposto ad analisi mediante RT PCR utilizzando i reagenti predisposti per effettuare un'analisi Realtime per verificare l'espressione del transgene e per studiare le possibili interazioni con i geni codificanti per la PGIP endogena di frumento.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il termociclatore MYCycler® della Bio-Rad. Anche in questo caso sono state scelte delle coppie oligonucleotidiche specifiche per i geni *Pvpgip2*, *Tapgip1* e *Tapgip2* al fine di garantire un'elevata efficienza di reazione PCR.

L'analisi di RT-PCR è stata eseguita utilizzando il kit "QuantiTect SYBR Green RT-PCR" della Qiagen.

Ogni reazione è stata condotta in un volume finale pari a 25 µl e utilizzando quantitativi variabili di RNA (da 150ng a 250ng).

In ogni tubo sono stati aggiunti:

2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Mix	12,5 µl
Primer F (100ng/ µl)	0,5 µl
Primer R (100ng/ µl)	0,5 µl
QuantiTect RT Mix	0,25 µl
Acqua libera da RNasi	variabile
RNA	variabile

Le condizioni utilizzate per la retrotrascrizione e l'amplificazione sono le seguenti:

Ciclo 1 (1X)	50°C per 30 min (retrotrascrizione dell'RNA in cDNA)
Ciclo 2 (1X)	95°C per 15 min (disattivazione retrotrascrittasi)
Ciclo3 (40X)	94°C per 15 sec (denaturazione DNA) 60°C per 1 min (appaiamento dei primers) 72°C per 30 sec (sintesi del DNA e acquisizione dei dati)
Ciclo4 (80X)	55°C per 10 sec Con un incremento di 0,5°C per ogni ciclo a partire da 55°C (Analisi Melt-Curve)

2.6.9 Sviluppo di oligonucleotidi specifici

Per le analisi PCR sono stati sviluppati dei primers specifici servendosi del programma Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) utilizzando le sequenze specifiche depositate in banca dati per i geni *Pvpgip2* (AJ786409) *FsTri101* (AF127176), *bar* (X17220) e le sequenze dei geni *Tapgip1* e *Tapgip2* (Janni et al 2006 sottoposto a pubblicazione) (Fig 18).

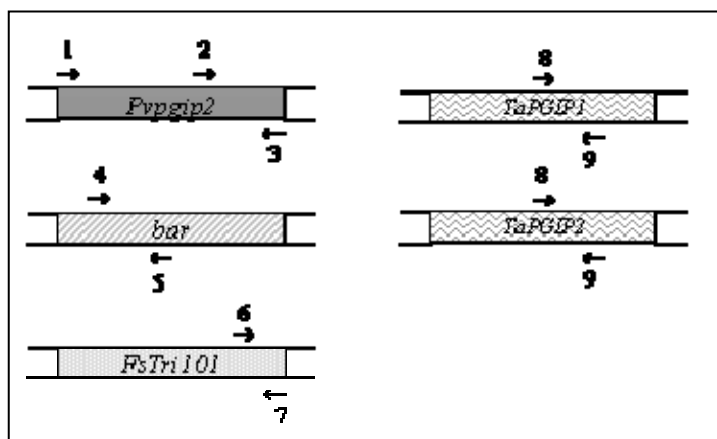


Fig 18. Diagramma lineare delle sequenze *PvpGip2*, *FsTri101*, *bar*, *Tapgip1* e *Tapgip2* con la relativa posizione degli oligonucleotidi utilizzati per le analisi PCR. Gli oligonucleotidi sono indicati con una freccia numerata che corrisponde alla numerazione degli oligonucleotidi descritti in Tabella 10.

Tabella 10 Oligonucleotidi utilizzati per lo screening e la caratterizzazione delle linee transgeniche.

Primer	Nome	Sequenza 5'→3'	Utilizzo
1	615F	CCTCACCGGGAAGATTCCG	screening piante T, RT-PCR
2	853R	TTAGCTGCGTCAGTCCCTGC	screening piante T, amplificazione sonda pUBISR2, RT-PCR
3	40F	TCTTTGAGCACTGCACA	amplificazione sonda
4	BAR1	CATCGAGACAAGCACGGTCA	screening gene marcatore
5	BAR2	GAAACCCACGTCATGCCAGT	screening gene marcatore
6	Tri101F	GGATGCTTCCACACCTACTG	Screening incroci
7	Tri101R	ACTTTGTCCACTCCTCATCC	Screening incroci
8	PGIPWH4F	CGC CGA GAA TAA CAA AGA CTG	RT-PCR
9	PGIPWH4R	TAG AGG TTG AGG ACG AGA AGC	RT-PCR

2.7 Determinazione enzimatica dell'attività della PvPGIP2

2.7.1 Estrazione delle proteine totali dalle foglie

L'estrazione delle proteine totali dalle foglie di linee transgeniche e di controllo, è stata effettuata omogeneizzando il tessuto vegetale con mortaio e pestello in presenza di azoto liquido. Al tessuto omogeneizzato è stato aggiunto un tampone di estrazione composto da NaCl 1M e Na-Acetato 20mM, in proporzioni pari a 2 ml ogni grammo di tessuto vegetale. La soluzione così ottenuta è stata incubata a 4°C in agitazione per un' ora. Il materiale vegetale è stato quindi centrifugato a 10000 x g per 20 minuti, ed il sopranatante è stato recuperato. Per eliminare i frammenti più grandi il sopranatante è stato centrifugato più volte per 5 minuti fino a quando la soluzione non è apparsa completamente limpida. Il campione è stato conservato a -20°C.

2.7.2 Saggio Bradford

Questo saggio consente di determinare la concentrazione delle proteine ed è stato effettuato utilizzando il Kit della PIERCE "Coomassie Plus Protein Assay Reagent".

Il saggio si basa sull'osservazione che l'assorbanza massima per una soluzione di Coomassie Brilliant Blue G-250 vira da 465 nm a 595 nm quando si forma il legame con le proteine. L'assorbanza del campione rispetto al bianco è stata quindi stimata tramite uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm e le misure ottenute sono state confrontate con quelle di uno standard BSA (l'albumina di siero bovino) a concentrazione nota. Tramite lo standard è stata costruita una retta di taratura (assorbanza contro µg di proteine) tramite la quale è stato possibile risalire alla concentrazione incognita della proteina in esame.

2.7.3 Saggio di diffusione su agarosio

Per effettuare questo saggio, detto anche saggio "Cup-Plate", vengono preparate delle piastre contenenti sodio acetato 100 mM pH 4.6, 0.5% acido poligalatturonico e 0.8% agarosio. All'interno di ogni piastra vengono praticati dei fori del diametro di 0.5 mm dove si applica una soluzione contenente la poligalatturonasi. Le piastre vengono incubate per 12 ore a 30°C e poi vengono sviluppate versandoci sopra una soluzione di HCl 6N. L'attività dell'enzima viene visualizzata dalla formazione di un alone attorno al foro centrale, come risultato della degradazione della matrice pectica, operata dall'enzima stesso. Se insieme alla PG si mette anche la PGIP, l'attività inibitoria che questa esercita sulla PG si manifesta in una riduzione dell'alone di degradazione. Sulla base di questo saggio si definisce 1APU (1 unità di diffusione

su agarosio) di PG come quella quantità di enzima necessaria a produrre un alone con raggio pari a 0.5 cm (escluso il diametro del foro centrale); analogamente l'unità di attività inibitoria di una data PGIP (1 IU) viene definita come la quantità di PGIP che inibisce 1 APU di PG del 50%.

Tutte le PG utilizzate nei diversi saggi, sono state fornite dal gruppo del Prof. Felice Cervone del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università "La Sapienza" di Roma e dal Prof. Francesco Favaron dell'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Padova.

2.7.4 Saggio degli zuccheri riducenti

Questo saggio viene effettuato all'interno di tubi di PIREX contenenti una miscela di reazione composta da: un substrato, costituito da acido poligalatturonico 0.5% (PGA) in tampone di sodio acetato 0.1M pH 4.6; la poligalatturonasi (PG) in quantità pari a 0,011 RU e i campioni contenenti la PGIP.

Tale miscela viene incubata a 30°C per 1 ora e successivamente bloccata aggiungendo 600 µl del reattivo A (NaCl 0.68M, Na₂SO₄ anidro 1.97M, Tampone Acetato 2M pH 5.1 e CuSO₄ 0,32M).

Parallelamente si effettua la preparazione di uno standard per il calcolo delle unità riducenti contenente concentrazioni note di acido galatturonico (20 mg e 40 mg). Anche queste soluzioni sono trattate con il reattivo A. Successivamente tutti i campioni vengono bolliti per 10 minuti e poi raffreddati in ghiaccio. Quindi si aggiungono 400 µl del reattivo B (MoNH₄ 0.04M, H₂SO₄ concentrato 21 ml, Na₂HASO₄*7H₂O 0.38 M) e 4 ml di acqua.

La successiva lettura allo spettrofotometro dell'assorbanza a 600 nm (lunghezza d'onda a cui si ha la massima assorbanza del molibdeno quando interagisce con il substrato), permette di calcolare l'unità di attività inibitoria di una data PGIP che inibisce del 50% l'attività della PG (Milner and Avigad, 1967).

2.7.5 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS

Per la separazione delle proteine è stato usato un apparecchio Mini-Protean II Cell (Bio-Rad). Il gel di poliacrilammide consiste di due fasi: il "gel di corsa", dove i complessi proteina-SDS si separano effettivamente in base alla massa, e il "gel spaziatore", il cui scopo è quello di concentrare i complessi anionici in bande sottilissime che poi vengono separate nel gel di corsa. E' stato utilizzato un gel dello spessore di 0,75 mm. Nel gel di corsa è stata usata una percentuale di monomeri ($T=100 \times [\text{grammi di acrilammide} + \text{grammi di bis-acrilammide/volume}]$) pari al 12% e di cross-linker ($C=100 \times (\text{grammi di bis-acrilammide/grammi di acrilammide} + \text{grammi di bis-acrilammide})$) pari a 2,67%, Tris-HCl

0,36 M pH 8,8, SDS 0,1%; nel gel spaziatore è stata usata una percentuale di monomeri del 3,75 e di cross-linker del 2,67%, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%. La composizione del tampone di corsa usato è: glicina 0,2 M, Tris 0,02 M pH 8,8, SDS 0,1%. La corsa è stata condotta ad un voltaggio costante (200 volts) fino a che il tracciante (γ -pironina) fuoriusciva dal gel.

I gel sono stati colorati in una soluzione contenente solfato di ammonio 8%, acido fosforico 0,8%, coomassie colloidale (CBBG-250) 0,08%, metanolo 20% per 6-24 ore e dopo sono stati decolorati in acqua corrente (Neuhoff et al, 1988).

2.7.6 Colorazione con Nitrato d'Argento

Le proteine sono state separate tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS. Il gel è stato poi colorato tramite lavaggi successivi in agitazione :

-1° lavaggio per minimo 30 minuti : 15 ml di metanolo(30 %) ,5 ml di acido acetico glaciale (10%) e 30 ml di acqua .

-2° lavaggio per 10 minuti : 15 ml di metanolo (30%) e 35 ml di acqua.

-3° lavaggio per 3 minuti : acqua

-4° lavaggio per 30 minuti al buio : 50 mg di Nitrato d'Argento , 75 μ l di formaldeide e acqua per portare ad un volume finale di 50 ml.

5° lavaggio ,due risciacqui veloci : 2.5 g (2.5 %) di carbonato di sodio, 50 ml (50%) di formaldeide e acqua per portare ad un volume finale di 100 ml. Per ogni risciacquo sono stati usati 50 ml di questa soluzione.

2.7.7 Western blot

Allo scopo di confermare l'identità della proteina PvPGIP2 è stata condotta un'analisi Western blot utilizzando un anticorpo policlonale prodotto contro la regione N-terminale della PvPGIP1 di fagiolo che ci è stato fornito dal Prof. Cervone del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università "La Sapienza" di Roma.

E' stata dapprima condotta un'analisi SDS-PAGE con le modalità descritte nel paragrafo 2.6.5 ma con valori di C=3.33 e T=12. Successivamente il gel è stato sottoposto a 3 lavaggi ciascuno di 5 minuti in 50 ml di tampone di trasferimento (25mM Tris, pH8.3; 192mM glycine e SDS 0.04%).

Per il blottaggio è stato utilizzato l'apparato Mini Trans-blot della Bio-Rad e una membrana PVDF (Bio-Rad); il tutto è stato assemblato con le modalità descritte nel manuale d'istruzioni dell'apparato. Una volta avvenuto il trasferimento, la membrana è stata saturata per 2 ore a temperatura ambiente in 100ml di Blocking solution (10mM Tris; 150mM NaCl; 0.1%

Tween20 e 5% di not fat dry milk); successivamente è stata lavata brevemente per due volte in 50 ml di Washing buffer (10mM Tris-HCl pH8; 150mM NaCl e 0.2% Tween20) e incubata per tutta la notte in 50 ml di una soluzione contenete l'anticorpo primario. Successivamente l'eccesso di anticorpo primario è stato rimosso effettuando una serie di lavaggi utilizzando 50ml di Washing buffer; in particolare sono stati effettuati prima due lavaggi brevi poi un lavaggio da 15 minuti e poi altri tre lavaggi brevi.

La membrana è stata quindi incubata in una soluzione di 50ml contenete l'anticorpo secondario (anticorpo anti-rabbit coniugato con la perossidasi di cavallo HRP) per 1 ora a temperatura ambiente.

L'eccesso di anticorpo secondario è stato eliminato con gli stessi lavaggi descritti per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario.

Il rilevamento delle proteine è stato effettuato utilizzando la reazione di chemiluminescenza con il reagente Luminolo della "Santa Cruz Technologies" seguendo la procedura indicata nel manuale.

2.7.8 Saggio degli Uronidi

Per questo saggio è stato utilizzato il metodo per la determinazione quantitativa di Blumenkrantz e Asboe –Hansen (1973).

Gli acidi uronici sono stati estratti partendo da 30 mg di campione vegetale (spighetta o culmo). Per ogni campione è stato fatto un duplicato. Il saggio è stato effettuato sia su campioni con PG (poligalatturonasi di *Fusarium moniliforme* 0.5 RU = unità riducenti, quantità di enzima in grado di rilasciare in 1 minuto a 30°C 1 μ mol di gruppi riducenti) che su campioni senza PG. I campioni sono stati sciacquati in acqua, poi sono stati aggiunti 250 μ l di Tampone acetato 20 mM pH 4.6.

È stata aggiunta la PG nei campioni con PG e i campioni sono stati incubati in bagnetto caldo a 30°C per 3.5 - 4 ore.

A 80 μ l di campione è stata aggiunto 1 ml di soluzione A (1.19 g di $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 250 ml di H_2SO_4). I campioni sono stati bolliti per 5 minuti in acqua a 100°C e posti in ghiaccio 10 minuti.

Ad ogni campione sono stati aggiunti 20 μ l di soluzione B (NaOH 0.5% e 0.15 g di Phenilphenolo).

Quando si è sviluppata la reazione di colorazione i campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 520 nm per avere una stima degli acidi uronici liberati in ogni campione.

2.7.9 Estrazione liquido extracellulare

Culmi di piante di frumento in stadio di sviluppo Zadoks 49 sono stati tagliati in sezioni da circa 3 cm, eliminando le sezioni contenenti i nodi, porzioni danneggiate e foglie. Sono stati rapidamente sciacquati in acqua distillata e successivamente processati secondo la procedura di estrazione mediante infiltrazione come riportato da Terry e Bonner (1980). Le sezioni ricavate sono state impacchettate su una retina di nylon da 105 μ m disposta al fondo di una siringa usa e getta. La siringa è stata infiltrata mediante pompa da vuoto per 3 minuti in una soluzione contenente 50mM sodio acetato pH 5 e NaCl 0,3 M, seguito da 3 minuti a pressione atmosferica nello stesso buffer. Dopo aver rimosso l'eccesso di liquido, la siringa contenente le sezioni, è stata attaccata ad un tubo da centrifuga e centrifugato a 1000g per 10 minuti a 4°C per estrarre il buffer contenente il liquido extracellulare (Salvi et al 1990).

2.7.10 Saggio della Glucosio-6 Fosfato Deidrogenasi (G6PD)

Il saggio si basa sulla riduzione del NADP^+ in NADPH ad opera della glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Il NADP viene ridotto dal G-6-PDH in presenza di G-6-P. La velocità di formazione del NADPH è proporzionale all'attività G-6-PDH e viene misurata spettrofotometricamente come un incremento nell'assorbanza a 340 nm.

Si misura quindi la quantità di NADPH formatosi leggendo la miscela di incubazione a 340nm.

Miscela di incubazione:

NADP⁺ 0,2mM 20 μ l

G6P 1mM 20 μ l

MgCl₂ 1mM 20 μ l

Estratto extracellulare circa 10 μ g

Gly-NaOH pH8 100mM fino ad un volume di 1ml

Seguo la reazione per 5 minuti.

Si fa una prova per verificare il corretto funzionamento dell'enzima sostituendo l'estratto con 1 μ l di G6PD (Roche) e monitorando la reazione per 5 minuti leggendo a 340nm.

Il tracciato della miscela contenente l'estratto extracellulare deve rilevare un'attività prossima allo zero per poter affermare che l'estratto extracellulare è privo di contaminanti intra-cellulari.

2.8 Infezioni delle piante transgeniche

2.8.1 Coltura in vitro dei funghi *Fusarium graminearum* e *Bipolaris sorokiniana* e preparazione inoculo.

Il ceppo 3287 di *Fusarium graminearum* è stato sub-culturato su piastre contenenti SNA (Urban et al 2002) contenente 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% KNO_3 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05% KCl , 0,02% glucosio, 0,02% saccarosio, 2% bactoagar (Difco) addizionato di 200ppm biotina e 200 ppm tiamina (Fig 19 A).

Il ceppo 62608 di *Bipolaris sorokiniana*, è stato invece sub-culturato in terreno PDA (Potato Destrose Agar Fluka) (Fig.19 B).

I conidi sono stati recuperati dalle piastre di coltura grattando la superficie con una spatola e il materiale risospeso in 3 ml di acqua distillata sterile. La concentrazione è stata stimata mediante l'ausilio di una camera di Thoma ed un microscopio ottico e la sospensione conidiale è stata diluita, se necessario, fino ad ottenere una concentrazione pari a 10^5 conidi/ml per *B. sorokiniana* (Bach et al 2003) e $5 \cdot 10^3$ conidi/ml per *F. graminearum* (Bai et al 2001). Qualora i conidi non fossero utilizzati al momento, è prevista l'aggiunta di 10% di glicerolo e sono conservati a -80°C .

Gli inoculi sono stati preparati portando le sospensioni alla concentrazione desiderata cioè 6000 conidi in 20 μl per *B. sorokiniana* e 1000 conidi in 20 μl per *F. graminearum*, alla sospensione viene aggiunto 0,05% di TWEEN 20.

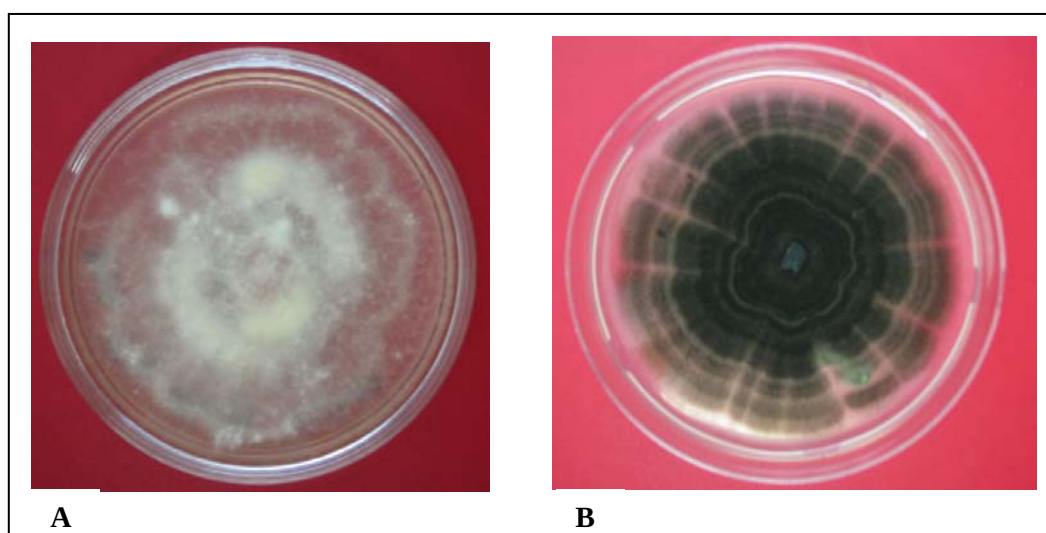


Fig.19 (A) Piastra contenente *F. graminearum*; **(B)** Piastra contenente *B. sorokiniana*

2.8.2 Crescita delle piante

Semi di piante transgeniche e di controllo vengono sterilizzati con ipoclorito di sodio 0,5 v/v per 15 minuti e successivamente risciacquate per due volte in acqua distillata per 10 minuti.

I semi così trattati vengono fatti germinare su carta bibula al buio per 4 giorni e successivamente trapiantati in vasi e fatti crescere in cella climatica con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di buio ad una temperatura diurna di 16°C e notturna di 14°C fino a che non raggiungono lo stadio corrispondente alla scala Zadoks 50. A questo punto la temperatura della cella climatica viene portata a 23°C diurni e 18°C notturni fino a maturazione.

Una volta raggiunto lo stadio Zadoks 92, momento idoneo per la raccolta, i semi vengono raccolti a mano separatamente per ogni spiga e per ogni pianta, imbustate e successivamente sgranate e conservati ad una temperatura di 4°C.

2.8.3 Test di virulenza su spiga con *Fusarium graminearum* e *Bipolaris sorokiniana*

Le piante sono state cresciute come descritto nel paragrafo precedente e concimate mensilmente con un concime 21.7.14 + MgO+ 27% SO_3 somministrato in una quantitativo pari a 150g/hl.

E' stato effettuato un unico esperimento in cui sono state infettate, per ciascuna linea, 15 piante positive (esprimenti la PvPGIP2) e 15 negative (non esprimenti la PvPGIP2).

Le piante nella fase di antesi precoce della fioritura (stadio Zadoks 68 vedi Fig 40sezione Risultati) sono state inoculate iniettando una sospensione di conidi contenente 6000 conidi in 20 μl . per *B. sorokiniana* e 1000 conidi in 20 μl nel caso di *F. graminearum*. L' inoculo è stato fatto depositando con una micropipetta 20 μl di sospensione su due spighe centrali di ogni spiga. È stata infettata solo una spiga per pianta. Sono state inoculate un totale di 15 piante positive e 15 piante controllo. Dopo l'infezione le spighe sono state coperte con un sacchetto di plastica per mantenere un'elevata umidità che favorisce lo sviluppo del fungo. Le piante sono state poste nella cella climatizzata a 20°C ed ombreggiate incappucciandole in buste di plastica per favorire lo sviluppo del fungo con il ciclo di temperature indicate nella sezione crescita delle piante. Il sacchetto è stato rimosso 48 ore dopo l'inoculo e le spighe sono state nebulizzate durante i 10 giorni successivi per mantenere elevato il tenore di umidità.

Il grado di virulenza è stato calcolato come percentuale di spighe infettate in ogni spiga a 8 e 21 giorni di distanza dall'inoculo (Bai et al 2001).

2.8.4 Test di virulenza su foglia con *Bipolaris sorokiniana*

Le piantine di frumento vengono inoculate allo stadio Zadoks 11 .La prima foglia precedentemente vaporizzata con acqua, viene inoculata spandendo 20 μl della sospensione

conidiale, contenente 6000 conidi, su tutta la superficie della foglia in seguito le piantine inoculate sono state ricoperte da una copertura in plastica per assicurare un elevato tenore di umidità.

I sintomi compaiono 48 ore dopo l'inoculo e si manifestano con la comparsa di macchie marroni o bruno rossastre di dimensioni variabili sulla superficie della foglia.

A 72 ore dall'inoculo le foglie inoculate sono state recise e scansionate ad una risoluzione di 450 dpi, e, successivamente, avvalendosi del programma Adobe Photoshop, è stata misurata l'area fogliare espressa in pixel/pollice, successivamente mediante fattori di conversione, l'area in pixel viene convertita in pollici², e poi in cm² di area lesionata. In ugual modo viene calcolato l'area totale della foglia.

2.9 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando le funzioni di analisi dei dati incluse nel pacchetto applicativo Microsoft Excell applicando il test t-student a due code ipotizzando varianze diverse tra i due gruppi presi in esame.

Risultati

3. RISULTATI

3.1 Produzione di piante transgeniche

Per verificare l'efficacia della PGIP nel proteggere piante di frumento dall'attacco di funghi patogeni che producono endopoligalatturonasi come il *Bipolaris sorokiniana* o il *Fusarium graminearum*, l'obiettivo perseguito è stato l'ottenimento di piante transgeniche di frumento sovraesprimenti la PvPGIP2. La scelta di utilizzare la PvPGIP2 è dovuta al fatto che essa è risultata, tra gli inibitori finora caratterizzati, quella dotata di un più ampio spettro di riconoscimento ed una maggiore efficienza di inibizione. Inoltre, la peculiare caratteristica della PvPGIP2 di riconoscere ed inibire la poligalatturonasi di *F. moniliforme* che non viene riconosciuta ed inibita dalle PGIP endogene di frumento (Pontiggia, 2005), ha reso questo inibitore il candidato più interessante anche per la semplicità di screening delle piante transgeniche.

3.1.1 Preparazione dei costrutti da utilizzare per la trasformazione genetica

Per l'ottenimento delle piante transgeniche sovraesprimenti il gene *Pvpgip2* è stato preparato un costrutto in grado di dirigere l'espressione della PvPGIP2 in tutti i tessuti della pianta.

Per la preparazione del primo costrutto è stato utilizzato il vettore d'espressione pAHC17 (Christensen and Quail, 1996). Tale vettore è caratterizzato dalla presenza del promotore dell'ubiquitina di mais *Ubi1* e permette il clonaggio di sequenze codificanti nel sito di restrizione *Bam*HI. Per effettuare questo clonaggio, la sequenza codificante la PvPPGIP2 è stata amplificata utilizzando degli oligonucleotidi contenenti i siti di restrizione di *Bam*HI a monte del codone d'inizio e a valle del codone di stop. Il prodotto PCR così ottenuto ed il vettore pAHC17 sono stati sottoposti a digestione enzimatica con *Bam*HI in modo da generare estremità compatibili per il clonaggio. I successivi esperimenti di clonazione hanno prodotto il costrutto pUBISR2 (Fig.20).

E' stato utilizzato anche un secondo costrutto, pUBI::BAR, contenente il gene *bar* per la selezione delle piante trasformate su terreno contenente l'erbicida Bialaphos. Anche questo costrutto il gene *bar* è sotto il controllo del promotore dell'ubiquitina di mais *Ubi1* (Fig.21).

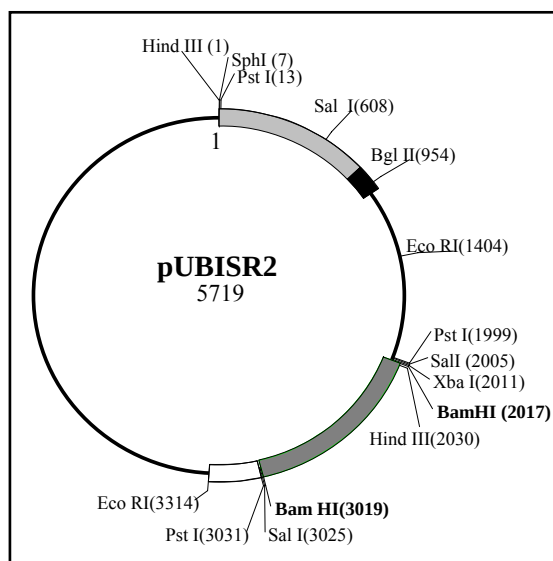


Fig.20 Plasmide pUBISR2 contenente il gene dell'ubiquitina e il gene *Pvpqip2*, utilizzato per il bombardamento delle linee J82 ed MJ.

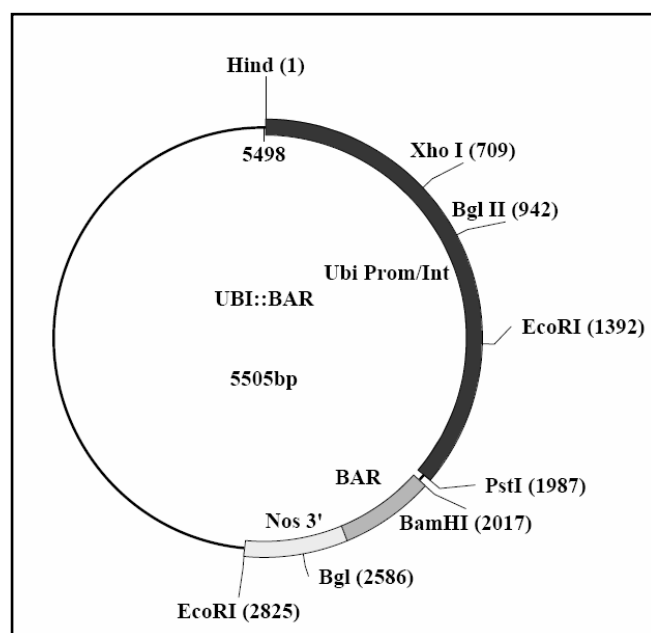


Fig.21 Plasmide pUBI::BAR contenente il promotore dell'ubiquitina e il gene *bar*, utilizzato per il bombardamento delle piante J82 ed MJ.

3.1.2 Generazione delle piante transgeniche

Il costrutto pUBISR2 ottenuto è stato utilizzato per bombardare embrioni immaturi della cultivar di frumento tenero Bobwhite seguendo la procedura riportata da Weeks et al 1993. Tale protocollo prevede il co-bombardamento del costrutto di interesse contenente il gene target e del costrutto contenente il gene marcatore. Per gli esperimenti eseguiti sono stati prelevati e bombardati 1528 embrioni nell'esperimento J82 e 1672 embrioni per l'esperimento MJ (Tabella 12).

L'esperimento di trasformazione J82 è stato eseguito in un unico esperimento di bombardamento, mentre quello MJ è stato eseguito effettuando 5 esperimenti di indipendenti come indicato in Tabella 11.

Tabella 11 Efficienza di trasformazione degli esperimenti di bombardamento MJ

# del bombardamento	#embrioni bombardati	# piante rigenerate poste in terreno
MJ1	240	16
MJ4	240	10
MJ5	280	2
MJ6	337	4
MJ7	335	32

La variabilità nel numero dei rigeneranti posti in terreno tra i diversi esperimenti di bombardamento è dovuta ad eventi di contaminazione verificatisi soprattutto negli esperimenti MJ5 e MJ6. Inoltre, in questo secondo esperimento, per limitare la perdita di germogli trasformati, si è deciso di prelevare e subcolturare tutti i germogli, inclusi quelli che mostravano poche radici avventizie, che molto spesso corrispondono a dei falsi positivi.

3.1.3 Selezione delle piante transgeniche

In totale, dalla rigenerazione dei calli su terreno di coltura contenenti il bialaphos, sono state ottenute 32 linee rigeneranti indipendenti dall'esperimento J82 e 64 dall'esperimento MJ (Tabella 12). Delle piante T0 rigenerate della linea J82 tre sono morte durante la fase di acclimatamento e 5 sono risultate sterili; analogamente per le linee MJ due sono morte durante la fase di acclimatamento. Queste piante non sono state pertanto analizzate per la presenza del transgene. Le piante rimaste sono state analizzate mediante PCR per verificare la presenza del transgene *Pvpgip2* utilizzando gli oligonucleotidi specifici 615F e 853R. La porzione amplificata da questa coppia di oligonucleotidi comprende 239 paia di basi della regione LRR

del gene *Pvpgip2*. Le amplificazioni sono state effettuate su DNA genomico estratto dalle foglie delle linee transgeniche e dal controllo negativo rappresentato dalla cv. Bobwhite ed esse hanno permesso di identificare molte linee positive ed alcune negative per la presenza del transgene (Tabella.12 ;Fig.22).

Tabella 12: Linee transgeniche prodotte ed analizzate mediante PCR.

Cv	Costrutto	# Bombardamento	Gene marcatore	# embrioni bombardati	T0*	T1**	T2***	T3
BW	pUBISR2	J82	UBI::BAR	1528	32	15	11	4
BW	pUBISR2	MJ	UBI::BAR	1672	64	10	8	2

*Numero di linee rigenerate dopo coltura su terreno selettivo e poste in terreno. Bombardamento **J82**:3 linee sono morte, 5 sono risultate sterili, e 9 sono risultate negative al test PCR per la presenza del transgene. Bombardamento **MJ**: 2 linee sono morte e 52 sono risultate negative.

In questa generazione ciascuna linee era costituita da 8 piante. Bombardamento **J82:4 linee sono morte.. **MJ**: 2 linee sono morte.

*** A partire da questa generazione sono state scelte le 6 linee caratterizzate nei Risultati.

Dall'analisi PCR effettuata sulle linee J82 nella generazione T0 è risultato che 15 erano positive per la presenza del transgene e 9 negative, analogamente per le linee MJ, 10 sono risultate positive e quarantotto negative (Tabella 12). Sulla base di questo risultato l'efficienza di trasformazione relativa alle piante contenenti il transgene è stata rispettivamente dello 0,98% e dello 0,59 % per l'esperimenti J82 ed MJ .

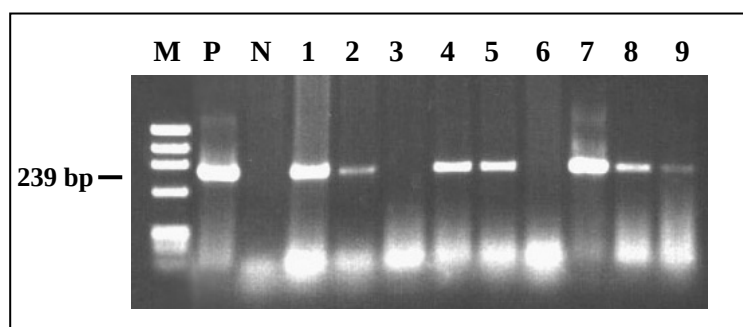


Fig.22 Separazione su gel di agarosio all'1.5% del prodotto PCR ottenuto con la coppia di oligonucleotidi 615F/853R da DNA estratto su una porzione di foglia. M, marcatore di pesi molecolari 100 bp; P, costrutto pUBISR2 utilizzato come controllo positivo; N, DNA genomico di Bobwhite utilizzato come controllo negativo; 1-9, alcune delle linee rigenerate su terreno selettivo nella generazione T0.

Tutte le linee risultate positive sono state moltiplicate per ottenere la generazione T1 e analizzate nuovamente mediante PCR per distinguere nella progenie le piante recanti il transgene da quelle che per segregazione lo avevano perso. Per quanto riguarda la linea J82 quattro ulteriori linee sono morte durante la crescita mentre 11 hanno confermato la presenza del gene *Pvpgip2*; per quanto riguarda le linee MJ, 2 sono morte e 8 hanno confermato la presenza del transgene.

Tutte le linee J82 ed MJ sono state moltiplicate e le risultanti progenie T2 saggiate per verificare l'attività della PvPGIP2. Le analisi di inibizione sono stati effettuati mediante saggio di diffusione su agarosio sfruttando la peculiare caratteristica della PvPGIP2 di riconoscere ed inibire la PG prodotta da *F. moniliforme* (Leckie et al. 1999) che non viene invece riconosciuta dalla PGIP endogena di frumento. Nel saggio di diffusione su agarosio l'attività inibitoria della PGIP nei confronti della PG di *F. moniliforme* è stata valutata utilizzando come controlli l'attività della PG, l'estratto proteico bollito della linea positiva e l'attività dell'estratto di Bobwhite (BW). Il primo è stato utilizzato come riferimento dell'attività idrolitica della specifica PG (100% di attività); il secondo è stato necessario per escludere che l'attività inibitoria fosse di natura non proteica; il terzo per escludere che l'eventuale attività riscontrata fosse attribuibile alle PGIP endogene di frumento (Fig. 23).

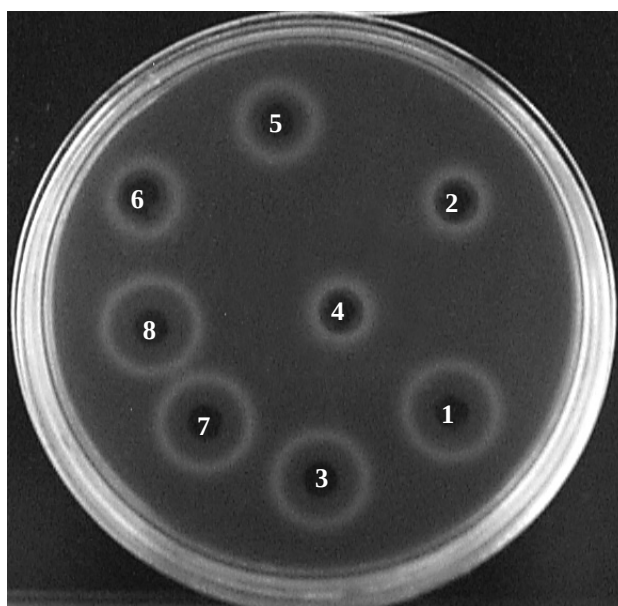


Fig.23 Analisi di diffusione su gel di agarosio (cup plate). 10 µg di estratto proteico delle linee transgeniche è stato sottoposto all'analisi "cup plate" contro la PG di *F. moniliforme*. Questa PG viene inibita dalla PvPGIP2 mentre la sua attività non viene influenzata dalla PGIP endogena di frumento. 1) PG di *F. moniliforme*; 2) J82-23a; 3) J82-100-8; 4) MJ7-4a; 5) J82-200; 6) J82-46c; 7) BW, 8) Estratto proteico bollito della J82-23a. E' evidente la differente attività inibitoria delle diverse linee ed in particolare la sua assenza nella linea J82-100-8.

Dall'analisi dell'attività inibitoria è risultato che 8 linee J82 erano in grado di inibire la PG di *F. moniliforme*, mentre 3 di queste non determinavano alcuna riduzione dell'attività PG, anche utilizzando un quantitativo doppio (20 µg) di estratto proteico totale. Per linee MJ soltanto 5 delle 8 hanno dato inibizione della PG di *F. moniliforme* (Fig.23).

Alcune delle linee che hanno mostrato presenza o assenza di attività inibitoria, sono state analizzate mediante analisi Southern blotting per verificare eventuali differenze nel numero di copie tra le linee.

Il DNA genomico è stato digerito con le endonucleasi di restrizione *Bam*HI e *Sph*I ed ibridato con la sonda corrispondente all'intera regione codificante il gene *Pvpgip2*. In entrambe le analisi, il DNA genomico di Bobwhite non ha mostrato alcun segnale di ibridazione, mentre la digestione con l'endonucleasi di restrizione *Bam*HI, che causa l'escissione dell'intera sequenza codificante la PvPGIP2, ha prodotto in tutte le linee transgeniche analizzate il frammento di ibridazione atteso di circa 1070 bp (Fig.24 A). Questo risultato è stato confermato dall'analisi con l'endonucleasi di restrizione *Sph*I, che taglia una sola volta all'interno del costrutto pUBISR2 generando un frammento di circa 5,7 kbp (Fig.24 B). In questo caso tutte le linee analizzate presentano, oltre al frammento di ibridazione atteso, anche degli altri frammenti che rappresentano molto probabilmente riarrangiamenti a carico del transgene. Questi frammenti aggiuntivi presentano un segnale di ibridazione più debole, eccetto nella linea J82-100-8 dove al contrario sono di elevata intensità (Fig.24 B). Questo risultato è particolarmente interessante se si considera che questa linea non presenta alcuna attività inibitoria nei confronti della PG di *F. moniliforme* (Fig.23).

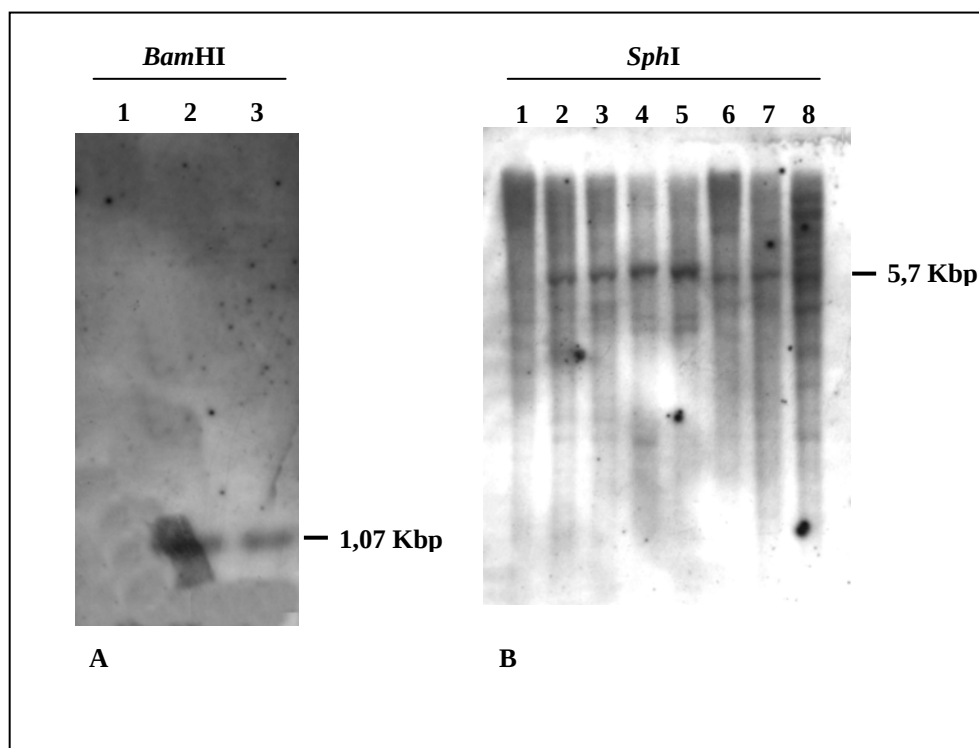


Fig 24. Southern blot di alcune linee transgeniche di frumento. Il DNA genomico (8 µg) è stato digerito con *Bam*HI (A) e *Sph*I (B) frazionato su gel di agarosio all'1,2% ed ibridato con la regione codificante del gene *Pvpgip2* marcato con digossigenina.; **(A)** 1) BW; 2) J82-46c-10-2; 3) J82-23a-1-1; **(B)** 1) BW; 2) J82-46c-10-2; 3) J82-46c-10-3; 4) J82-23a-1-1; 5) J82-23a-1-2; 6) J82-23-37-1; 7) J82-23-37-3; 8) J82-100-8.

3.2 Scelta delle linee per le successive analisi

L'analisi genomica e proteica delle linee T2 prodotte ha dimostrato che in tutte le linee è presente il transgene e che presentano livelli differenti di attività inibitoria. Su questa base, per le successive analisi funzionali ne sono state selezionate sei che presentavano una differente capacità di inibizione nei confronti della PG di *F. moniliforme*. In particolare, quattro di queste, J82-23a, J82-23-37, J82-46c e MJ7-4a mostravano una maggiore inibizione rispetto alla J82-200 e la MJ5-1.

Inoltre, poiché il bombardamento e l'eventuale evento di inserzione costituiscono, di per se, uno stress enorme per il genoma, tale da provocare anche importanti riarrangiamenti genomici con possibili effetti sulla fisiologia della pianta, per gli esperimenti che seguiranno si è scelto di utilizzare non solo il controllo negativo rappresentato dalla cv Bobwhite ma anche una pianta della linea transgenica che in seguito alla segregazione abbia perso il transgene e che chiameremo linea sorella di controllo o per brevità linea di controllo.

Pertanto nei successivi esperimenti per ogni linea verranno utilizzate sia piante recanti il transgene (positive) sia piante prive del transgene (negative).

3.3 Presenza del gene marcatore

La presenza del gene marcatore è stata verificata nella generazione T3 delle linee transgeniche recanti il gene *Pvpgip2* mediante analisi PCR sul DNA genomico utilizzando la coppia di oligonucleotidi specifici Bar1 e Bar2 sviluppati utilizzando la sequenza depositata in banca dati del gene *bar* dello *Streptomyces hygroscopicus* (accessione X17220). La separazione dei prodotti PCR su gel di agarosio all'1,5% ha evidenziato la presenza del frammento atteso di 405 bp (Fig.25). Pur confermando, quindi, la presenza del gene *bar* in queste linee, questa analisi non ci consente di stabilire la sua eventuale espressione né il numero di copie inserite.

Come atteso, il gene marcatore è presente in tutte le linee come è riportato anche da Stoger et al (1998) che ha osservato una co-segregazione dei geni co-bombardati in grano, indicando l'inserzione in un singolo locus.

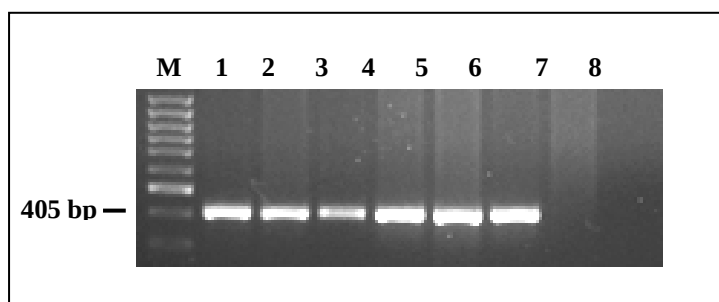


Fig.25 Elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% dei prodotti PCR di alcune piante transgeniche per controllare la presenza del gene marcatore *bar*. M, marcatore dei pesi molecolari 100 bp; 1) J82-23; 2) J82-23-37; 3) J82-46c; 4) MJ5-1; 5) MJ7-4; 6) J82-200; 7) Bobwhite; 8) controllo negativo costituito dall' acqua

3.3 Analisi dell'espressione della PvPGIP2 transgenica

La presenza della proteina transgenica è stata ulteriormente verificata sia mediante saggi di inibizione che analisi di Western blotting.

3.3.1 Saggi di inibizione delle linee selezionate

Le analisi di attività sulle 6 linee selezionate sono state effettuate su estratti proteici totali utilizzando due saggi: il saggio di diffusione su agarosio (cup-plate) (Taylor and Secor, 1998) ed il saggio degli zuccheri riducenti (Milner and Avigad, 1967).

Nel saggio di diffusione su agarosio l'attività inibitoria della PGIP nei confronti della PG di *F. moniliforme* è stata valutata utilizzando come controlli l'attività della PG, l'estratto proteico bollito della linea positiva, l'estratto proteico della linea sorella negativa e l'attività dell'estratto di Bobwhite (BW).

I saggi sono stati effettuati usando da 1 a 10 µg di estratto proteico ed una quantità di PG di *F. moniliforme* pari a 0,011 RU. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le 6 linee analizzate presentano una specifica attività inibitoria contro la PG di *F. moniliforme* confermando la differente efficienza, probabilmente causata da differenti livelli di espressione.

Sulla base della differente attività inibitoria riscontrata tra le 6 linee, sono stati effettuati dei saggi degli zuccheri riducenti per stimare con maggiore precisione la differenza di attività presente tra le linee. Per ottenere ciò, con questo saggio è stata calcolata la quantità di estratto grezzo proteico necessario per inibire del 50% l'attività della PG di *F. moniliforme*. Come riportato in Tabella 13 le 6 linee possono essere distinte in due gruppi sulla base dei loro livelli di inibizione. Un gruppo comprendente le linee J82-46c, J82-23, J82-23-37, MJ7-4 è caratterizzato da una elevata attività inibitoria, mentre l'altro, composto dalle linee J82-200 e MJ5-1, presenta un'attività inibitoria 3-9 volte inferiore (Fig.26).

Tabella.13 Quantità in ng di estratto proteico grezzo totale necessario per inibire del 50% l'attività di 0,011 RU di PG di *F. moniliforme*

Linea	PG utilizzata	ng proteina
J82-46c	<i>F. moniliforme</i>	301
J82-200		1684
J82-23a		488
J82-23-37		311
MJ5-1		2752
MJ7-4a		278

ng di estratto proteico totale necessaria per inibire del 50% l'attività di *F. moniliforme*

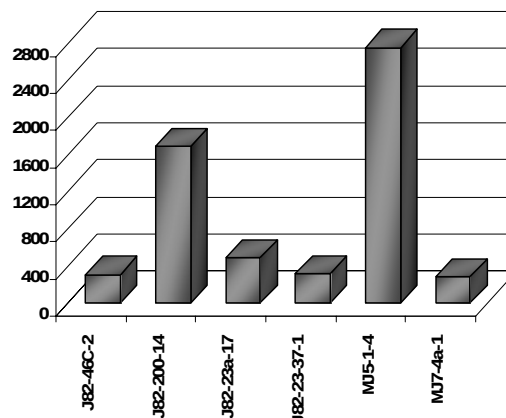


Fig.26 Variabilità nell'espressione della proteina transgenica nelle linee in esame verifica mediante saggio di inibizione Milner- Avigad.

3.3.2 Analisi mediante Western blot

Sulla base dei risultati ottenuti dal saggio Milner-Avigad l'estratto proteico di ciascuna linea, in quantità pari a quella necessaria a dare un'inibizione del 50%, è stato analizzato mediante analisi Western blot.

Gli estratti proteici sono stati frazionati su gel di poliacrilammide e trasferiti su filtro. In seguito ad ibridazione con un anticorpo policlonale specifico per la PGIP di fagiolo è stato riscontrata la presenza di un segnale di ibridazione PGIP specifico con una massa molecolare di circa 39000, assente nelle piante controllo e nella cultivar Bobwhite (Fig.27).

Il risultato del western ha confermato l'esistenza tra le diverse linee di una variabilità nell'espressione della proteina transgenica. In particolare, le linee J82-200 e MJ5-1 mostravano un più debole segnale di ibridazione rispetto a quello delle altre linee (Fig.27).

Queste analisi, insieme a quelle di attività, sono state effettuate anche su piante di generazioni successive verificando che le linee MJ7-4a, J82-200 presentano una notevole variazione dei livelli di espressione nel corso delle generazioni, mentre le linee J82-23a, J82-46c e J82-23-37 mostrano un livello di espressione stabile nel tempo. La linea MJ5-1 non è stata ancora testata mediante saggio di inibizione Milner- Avigad per quantificare precisamente l'attività della proteina transgenica ma analisi preliminari mediante saggio cup-plate mostrano che anch'essa sembrerebbe avere un'espressione non stabile nel corso delle generazioni.

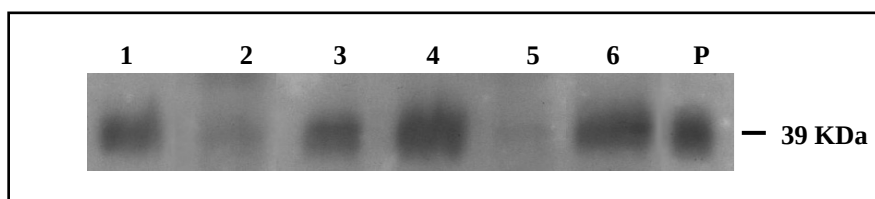


Fig.27 Analisi Western blot delle linee transgeniche in esame: 1) J82-46c-2; 2) J82-200-14; 3) J82-23a-17; 4) J82-23-37-1; 5) MJ5-1-4; 6) MJ7-4a-1; P) PvPGIP2 purificata (50 ng) .

3.4 Analisi dell'espressione della PvPGIP2 nei diversi tessuti delle piante transgeniche di frumento

Il promotore costitutivo *Ubi1* utilizzato nel costrutto pUBISR2 consente l'espressione del transgene in tutti gli organi della pianta. Per verificare questa modalità di espressione nelle nostre linee transgeniche abbiamo analizzato diversi tessuti e organi nella linea J82-23a. I tessuti analizzati sono stati : foglie, culmi, colletto, radici e spighe; queste ultime sono state ulteriormente suddivise in glume ed ovari più stimma (Fig.28). Gli estratti proteici grezzi dei tessuti specificati sono state testate mediante saggio Cup-plate utilizzando la PG di *F. moniliforme* come descritto precedentemente. Come atteso la proteina transgenica è correttamente espressa in tutti i tessuti analizzati (Fig.29).

Da sottolineare la corretta espressione della PVPGIP2 negli organi fiorali e nelle foglie poiché questi tessuti sono direttamente coinvolti nei primi stadi di infezione, rispettivamente, dei patogeni fungini *F. graminearum* e *B. sorokiniana* che abbiamo utilizzato negli esperimenti di infezione (vedi paragrafi successivi).

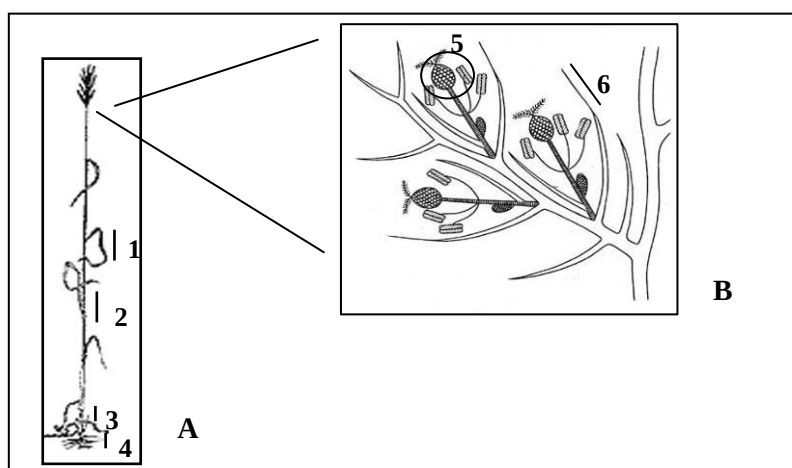


Fig.28 In figura sono indicate le sezioni scelte per la determinazione dell'attività inibitoria **A)** Pianta di frumento in Zadoks stage 70. (1) Foglia; (2) culmo; (3) colletto; (4) radici; **B)** Particolare degli organi fiorali della spiga di frumento. (5) ovario più stimma; (6) gluma.

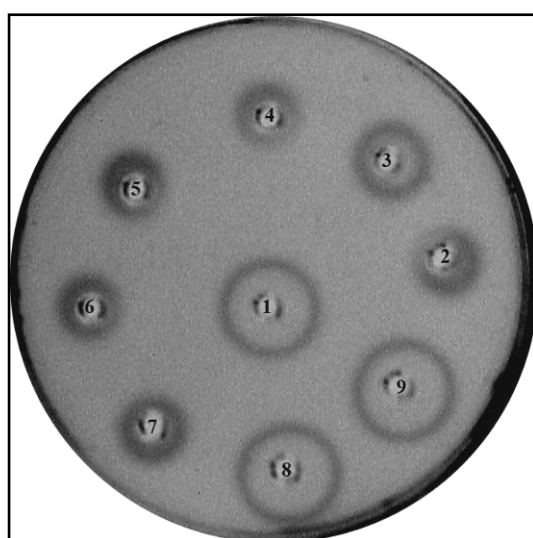


Fig.29 Cup-plate utilizzando circa 1 µg di estratto proteico totale di diversi tessuti della linea transgenica J82-23a. 1) 0,011 RU della PG di *F. moniliforme*; 2) culmi; 3) Radici; 4) Ovari e stimmi; 5) Glume; 6) Foglie; 7) Colletto; 8) Culmo, estratto bollito; 9) Radici, estratto bollito..

3.5 Analisi fenotipica delle piante transgeniche

Per quanto riguarda la germinazione, la crescita, il portamento, il periodo di fioritura, il numero di spighe prodotte, non abbiamo riscontrato alcuna evidente alterazione nelle piante transgeniche (T) rispetto alle piante di controllo (C) ed al Bobwhite (BW) (Fig.30). Tuttavia sono state evidenziate delle lievi differenze nella fioritura ed in particolare nella fase di estrusione delle antere (Zadoks stage 68) (Chang et al., 1974), che nelle piante transgeniche non sempre avviene al termine dell'antesi ma è piuttosto ritardata e corrisponde invece ad una fase in cui la cariosside è già in formazione.

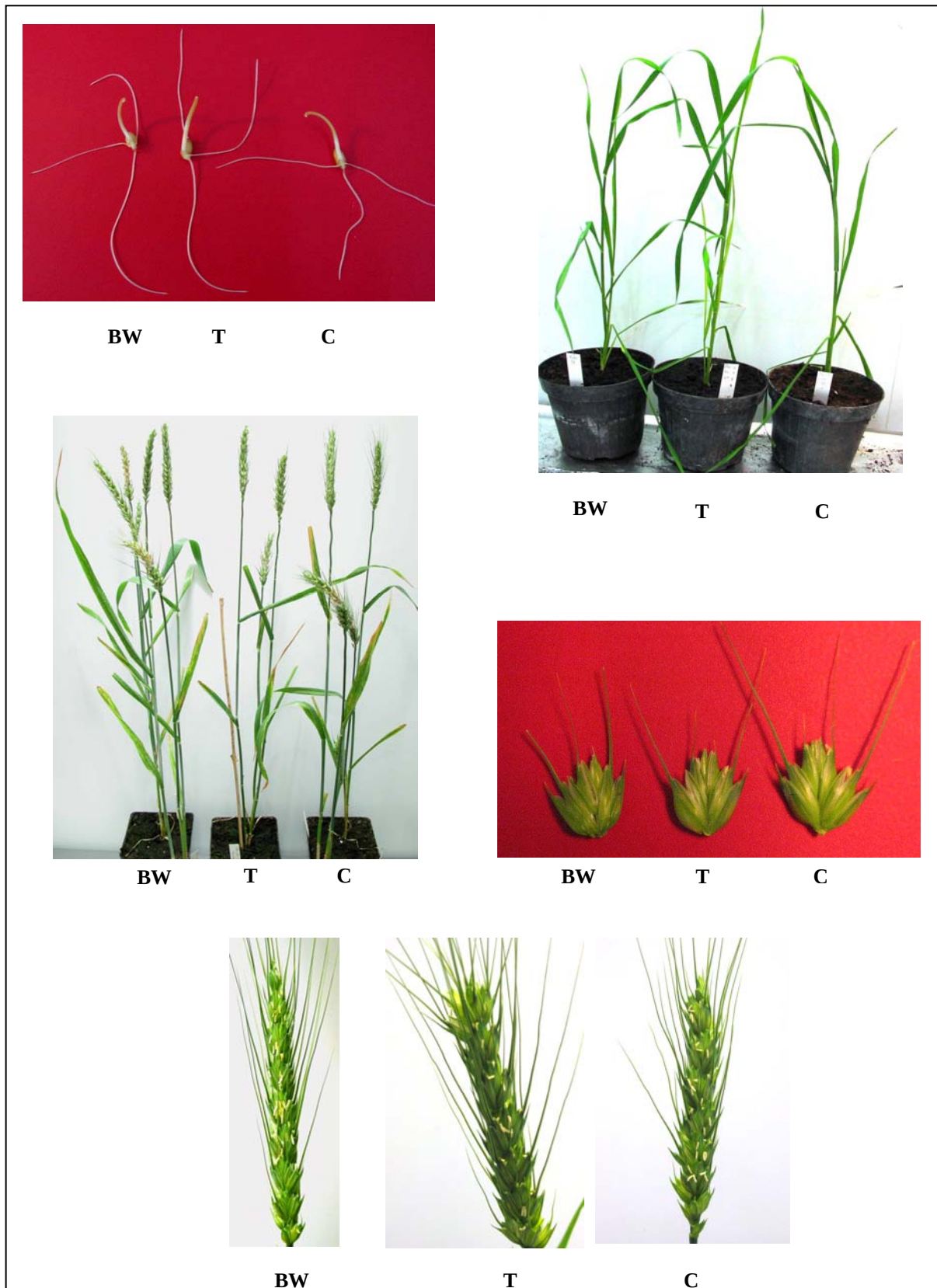


Fig.30 Analisi fenotipica della linea J82-23a piante transgeniche (T), di controllo (C) e Bobwhite (BW).Non è possibile osservare nessuna differenza significativa a livello fenotipico

3.6 Localizzazione sub-cellulare della PvPGIP2

Come schematizzato in figura 31, il costrutto pUBISR2 contiene tutta la regione codificante la *Pvpgip2* di fagiolo, inclusa la sequenza leader che codifica per il peptide segnale che determina la sua localizzazione apoplastica. Per verificare se la proteina transgenica viene correttamente trasportata nell'apoplasto delle piante transgeniche abbiamo eseguito delle estrazioni del liquido extra-cellulare mediante infiltrazione come descritto in materiali e metodi. L'estratto grezzo extra-cellulare è stato analizzato mediante saggio di inibizione su agarosio (cup plate) utilizzando 10 µl o 30 µl dello stesso contro 0,011 RU di PG di *F. moniliforme* (Fig.31). Il confronto delle attività inibitorie degli estratti extra-cellulari delle linee transgeniche con i relativi controlli ci ha consentito di stabilire che la PvPGIP2 transgenica delle 6 linee analizzate risulta correttamente espressa nel liquido extra-cellulare. Tra i controlli è stato anche incluso un saggio di attività enzimatica della Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PD) (Kornberg and Horecker 1955) che ha consentito di escludere che l'attività inibitoria osservata fosse dovuta a contaminazione di liquido intra-cellulare.

Anche se il risultato non può essere considerato quantitativo, questi saggi hanno evidenziato una differente attività inibitoria tra le diverse linee (Fig.31), dove è risultata particolarmente elevata quella delle linee J82-23a e J82 23-37. Questo risultato è stato confermato anche dalle analisi SDS-PAGE e di Western blot degli stessi estratti extra-cellulari. Come si può vedere in figura 32 le linee J82-23a, J82-23-37 presentano un evidente accumulo di un polipeptide di 39 KDa (Fig.32 A) che viene riconosciuto dall'anticorpo policlonale sviluppato contro la PGIP di fagiolo (Fig.32 B).

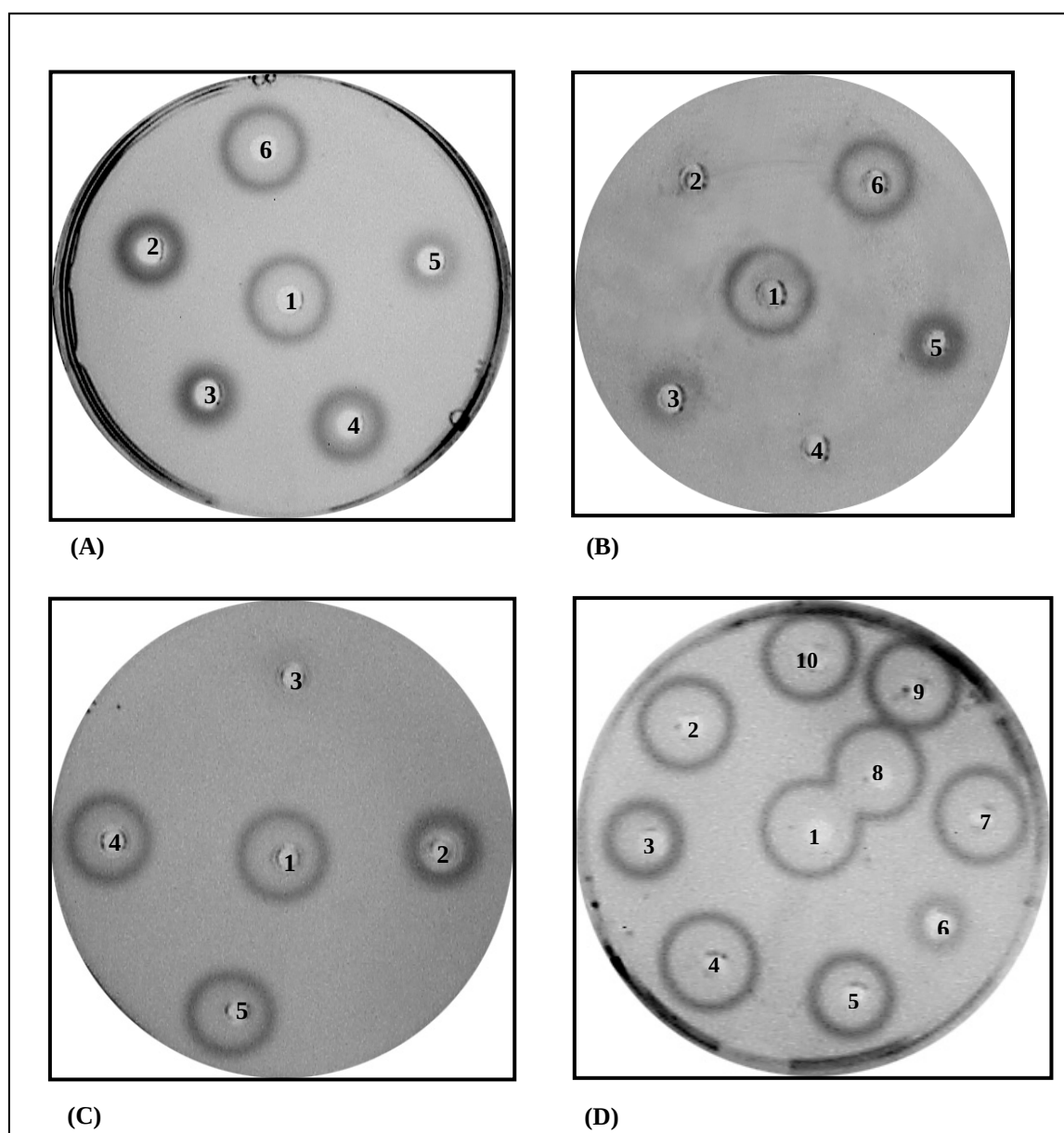


Fig.31 Analisi cup plate del liquido extra-cellulare contro la Pg di *F. moniliforme*. **(A)** (1) 0,011 RU di PG *F.moniliforme*; (2) MJ5-1 estratto grezzo extracellulare; (3) MJ5-1 estratto totale; (4) MJ7-4a estratto grezzo extracellulare; (5) MJ7-4a estratto totale; (6) MJ5-1 estratto extracellulare bollito. **(B)** (1) PG; (2) J82-23-37 estratto grezzo extracellulare; (3) J82-23-37 estratto totale; (4) J82-23a estratto grezzo extracellulare; (5) J82-23a estratto totale; (6) J82-23a estratto extracellulare bollito. **(C)** (1) PG; (2) J82-46c estratto grezzo extracellulare; (3) J82-46c estratto totale; (4) J82-46c estratto grezzo extracellulare bollito; (5) J82-46c estratto totale bollito. **(D)** (1) PG; (2) BW estratto grezzo extracellulare; (3) J82-200 estratto grezzo extracellulare; (4) BW estratto totale; (5) J82-200 estratto totale; (6) proteina PGIP2 purificata; (7) BW estratto grezzo extracellulare bollito; (8) J82-200 estratto grezzo extracellulare bollito; (9) BW estratto totale bollito; (10) J82-200 estratto totale

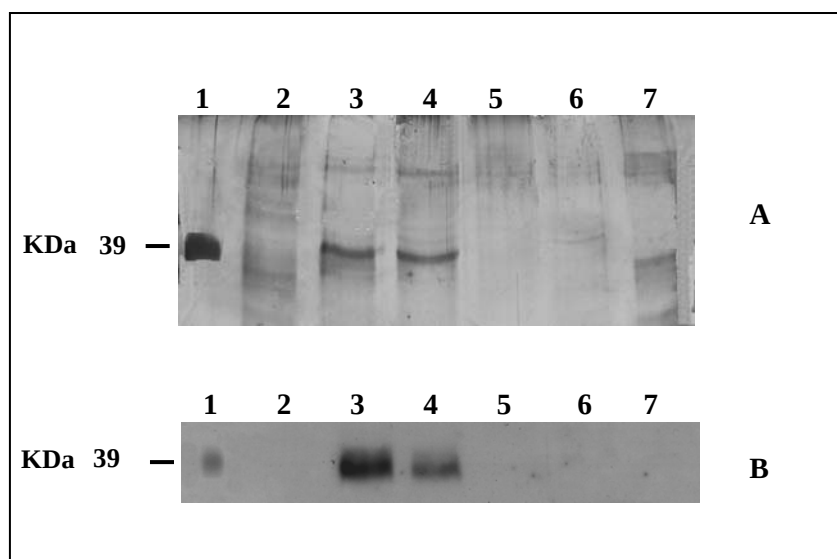


Fig.32 A) SDS-PAGE al'12% del liquido extra-cellulare delle 6 linee transgeniche analizzate. Per ciascun campione sono stati caricati 10 μ l di estratto proteico extra-cellulare e come controllo sono stati utilizzati 50 ng di proteina PvPGIP2 purificata. Dopo frazionamento il gel è stato sottoposto a colorazione con nitrato d'argento. **B)** Western blot del liquido extra-cellulare delle 6 linee analizzate ibridato con un anticorpo policlonale contro la PGIP di fagiolo. Campioni analizzati: 1)PvPGIP2; 2)J8-200; 3) J82-23a; 4) J82-23-37; 5) M65-1; 6)J82-46c; 7)MJ7-4a

3.7 Attività idrolitica della PG di *Fusarium moniliforme* sul tessuto delle piante transgeniche

Per verificare l'attività inibitoria della PvPGIP2 *in vivo*, sono stati effettuati degli esperimenti di idrolisi del tessuto vegetale delle piante transgeniche con la PG di *F. moniliforme*. Gli esperimenti sono stati effettuati in doppio su frammenti di culmo di piante transgeniche e di controllo trattati con 0,5 RU di PG di *F. moniliforme*. L'attività idrolitica della PG di *F. moniliforme* è stata valutata dopo 10 ore di digestione misurando spettrofotometricamente il rilascio degli uronidi della parete cellulare seguendo la procedura riportata da Blumenkrantz et al (1973).

Come riportato in figura 33, i risultati ottenuti hanno dimostrato una chiara riduzione dell'attività idrolitica sul tessuto delle piante transgeniche. Infatti, paragonando il Δ (rappresentato dalla linea verticale nera in figura 33) tra uronidi rilasciati nel campione trattato con PG e il suo controllo con acqua nelle piante transgeniche e in quelle di controllo, è evidente che l'attività di degradazione della PG è inferiore nel tessuto transgenico (in bianco) rispetto a quella riscontrata nei tessuti delle piante di controllo (in nero) (Fig.33).

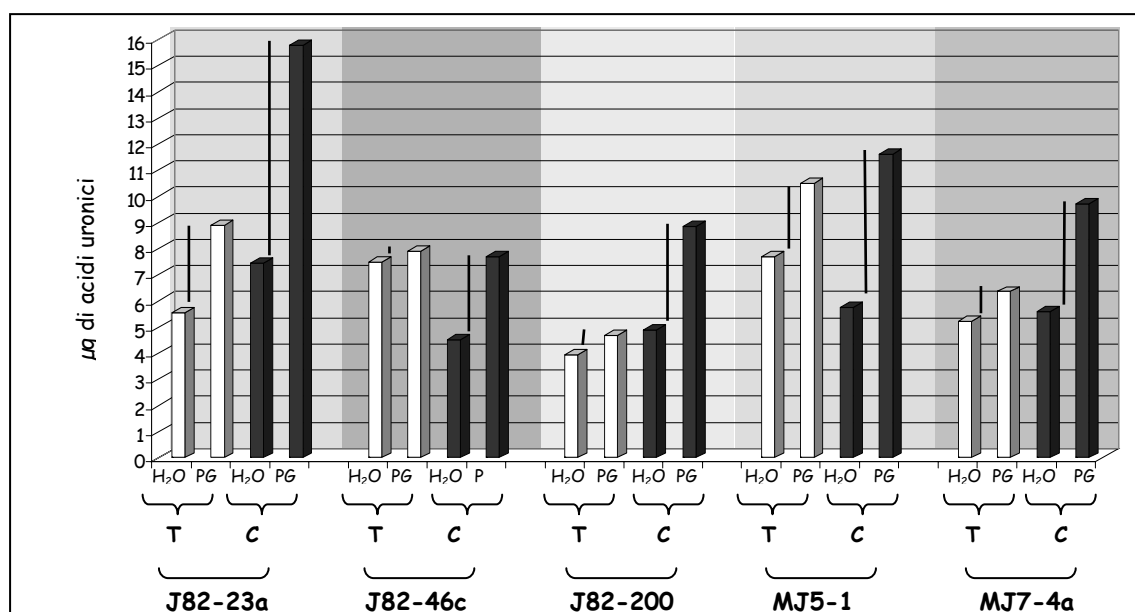


Fig.33 Saggio degli uronidi. La linea nera verticale indica l'incremento in μg di uronidi rilasciati in seguito al trattamento con la PG di *F. moniliforme* rispetto al trattamento con acqua, sia nelle piante transgeniche che nelle piante di controllo.

3.8 Analisi dell'espressione del gene *Pvpgip2* e dei geni *pgip* endogeni di frumento mediante RT-PCR

Per verificare se l'espressione della PvPGIP2 nelle linee transgeniche non influenzi negativamente l'espressione della PGIP endogena di grano, l'RNA totale di piante in T2 della linea J82-23a è stato utilizzato per effettuare un'analisi RT-PCR.

Tale verifica è necessaria poiché in molti casi riportati la presenza di numerose copie del transgene e/o di un suo elevato livello di espressione induce co-soppressione genica, che si realizza con il silenziamento del transgene e del gene endogeno, soprattutto quando questo ha un'elevata omologia di sequenza con il transgene (Vaucheret H., et al, 1998). Nel nostro caso l'identità di sequenza a livello nucleotidico tra i geni *pgip* di frumento e la *Pvpgip2* è circa del 50%, ma la caratteristica struttura modulare LRR è fortemente conservata.

Le reazioni di RT PCR sono state allestite utilizzando una coppia oligonucleotidica specifica per il transgene già utilizzata in precedenza (615F/853R) che danno un amplificato di 239 bp (Fig. 34 A) ed un'altra coppia di oligonucleotidi disegnata sulle sequenze dei geni *Tapgip* (PGIPWH4F/PGIPWH4R) che danno un amplificato di 230 bp (Janni et al 2006 sottoposto a pubblicazione) (Fig. 34 B).

I risultati di questa analisi, in cui è stato incluso anche l'RNA totale della cv Bobwhite, hanno confermato che sia il transgene che i geni *pgip* endogeni sono espressi nella linea transgenica J82-23a indicando che non si è verificato, almeno per la linea testata, alcun evento di co-soppressione

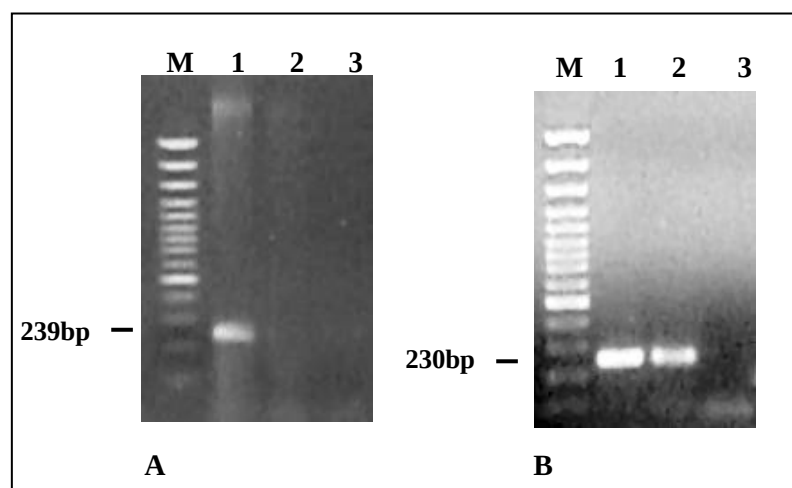


Fig.34 Analisi su gel di agarosio 1,5% dei frammenti di RT-PCR ottenuti **(A)** con primers specifici per le *Tapgip* endogena. **(B)** con primers specifici per la *Pvpgip2* sui campioni :M: marker di peso molecolare 100bp Ladder-Plus; 1)J82-23a; 2) Bobwhite; 3) acqua

3.9 Risposta delle piante transgeniche all'infezione con *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum*

La valutazione della risposta di resistenza delle piante transgeniche ai patogeni è stata effettuata su tre linee transgeniche caratterizzate da una diversa attività inibitoria: J82-23 e MJ7-4 con un'attività inibitoria elevata e la J82-200 con un'attività inibitoria bassa.

Preliminarmente sono stati effettuati dei saggi di inibizione su agarosio per verificare la capacità della PvPGIP2 di inibire la PG prodotta da *B. sorokiniana* e *F. graminearum*. Questi esperimenti sono stati effettuati utilizzando sia la PvPGIP2 purificata sia gli estratti proteici totali delle piante transgeniche da analizzare. I saggi cup plate hanno dimostrato che sia la PvPGIP2 purificata sia gli estratti totali delle 3 linee sono in grado di inibire completamente gli estratti grezzi delle PG dei due funghi patogeni sopra specificati.

In seguito a questi risultati positivi sono stati allestiti gli esperimenti di infezione. L'analisi della risposta di difesa è stata effettuata conducendo tre esperimenti indipendenti in ciascuno dei quali sono state infettate, per ciascuna linea, 15 piante positive (esprimenti la PvPGIP2) e 15 negative (non esprimenti la PvPGIP2) per un totale di 45 piante positive e 45 negative.

3.9.1 Infezione su tessuto fogliare con *Bipolaris sorokiniana*

Le tre linee prese in esame, J82-23a, J82-200, MJ7-4, sono state infettate con il ceppo 62608 di *B. sorokiniana*, utilizzando 6000 conidi in 20 µl di soluzione, quando le piante erano allo stadio di seconda foglia (stadio Zadoks 11; Fig.35).



Fig.35 Piantine di frumento transgenico in Zadoks stage 11

La prima foglia di piantine di 7 giorni, precedentemente vaporizzata con acqua, è stata inoculata spandendo 20 µl della sospensione conidiale su tutta la superficie della foglia; in seguito le

piantine inoculate sono state ricoperte da una copertura in plastica per assicurare un elevato tenore di umidità.

I sintomi compaiono 48 ore dopo l'inoculo e si manifestano con la comparsa di macchie marroni o bruno rossastre di dimensioni variabili sulla superficie della foglia.

A 72 ore dall'inoculo le foglie inoculate sono state recise e scansionate ad una risoluzione di 450 dpi e, successivamente, avvalendosi del programma Adobe Photoshop, è stata misurata l'area fogliare che manifestava sintomi e calcolato il rapporto rispetto all'area totale della foglia. (Tabella 14 Fig.36) In questo modo è possibile stimare in percentuale l'incidenza della sintomatologia della malattia ed elaborare i grafici sotto riportati.

Tabella 14: Valori medi delle lesioni fogliari in piante transgeniche e di controllo infettate con conidi di *Bipolaris sorokiniana* rilevata 72 ore dopo l'infezione. Ciascun esperimento d'infezione è stato effettuato utilizzando 15 piante transgeniche e 15 piante controllo. I valori medi delle piante transgeniche sono significativamente differenti dal controllo ($P \leq 0,05$) utilizzando il test t- student.

LINEA	Esperimento 1		Esperimento 2		Esperimento 3		Combinazione esperimenti 1-3	
J82-23a T	0,78 ± 0,14	a,b	1,68±0,4	a,b	0,65±0,09	a,c	1±0,15	a,b
J82-23a C	1,43±0,27	a,b	3,27±0,75	a,b	1,06±0,3	a,c	1,98±0,3	a,b
J82-200 T	1,03±0,3	a,b	0,47±0,11	a,c	0,28±0,05	a,b	0,58±0,12	a,b
J82-200 C	2,3±0,48	a,b	0,73±0,15	a,c	0,5±0,098	a,b	1,1±0,18	a,b
MJ7-4a T	0,55±0,12	a,c	0,49±0,16	a,c	1,18±0,21	a,b	0,7±0,1	a,b
MJ7-4a C	0,74±0,27	a,c	0,66±0,098	a,c	2,5±0,48	a,b	1,3±0,2	a,b

a Media del rapporto area sintomatica/ area totale x 100

b Medie piante T significativamente differenti ($p=0,05$) dalle piante C

c Medie piante T non significativamente differenti ($P=0,05$) dalle piante C

Nello specifico, i dati riportati corrispondono alla media delle lesioni fogliari, rilevate in ciascun esperimento, con il relativo errore standard ed elaborati globalmente per calcolare il valore medio delle lesioni fogliari nei tre esperimenti.

Il test t di student applicato al set di dati indica che per la linea J82-23a la media delle lesioni riscontrate sulle foglie delle piante T è significativamente inferiore ($P \leq 0,05$) a quella riscontrata per la linea controllo, questo è valido sia considerando la media di due dei tre esperimenti condotti, sia considerando la media complessiva dei tre esperimenti; lo stesso vale per la linea J82-200, mentre per la linea MJ7-4a, che è quella che presenta una minore attività inibitoria

rispetto alle due precedenti, il test t-student indica che, soltanto per il test 3 e per la media complessiva, la riduzione nella sintomatologia è significativa.

L'analisi della media totale dei tre esperimenti (Fig. 36) ci consente di calcolare la protezione conferita dalla PvPGIP2 transgenica che risulta essere del 49% per la line J82-23a, del 47,2% per la J82-200, 46% per la MJ7-4a.

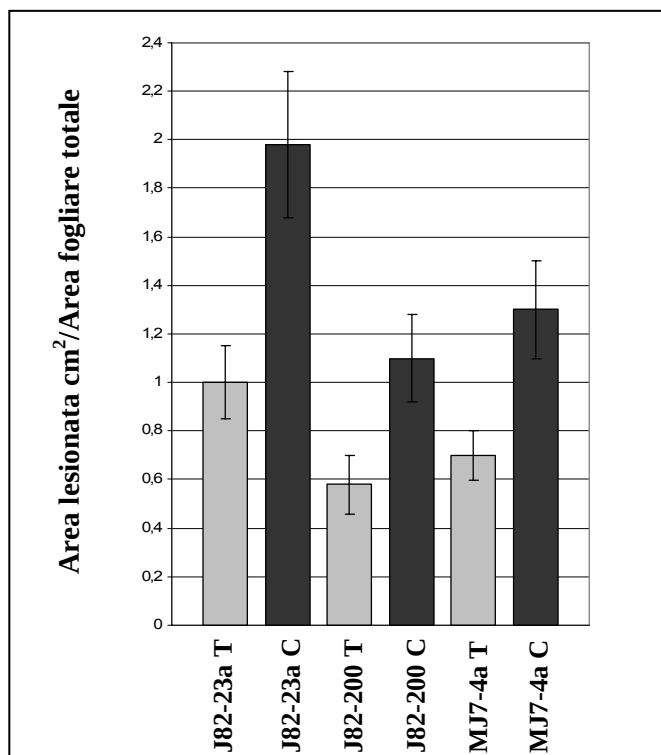


Fig.36 Grafico dei valori medie delle lesioni fogliari, rilevate 72 ore dall'inoculo con *B. sorokiniana* in piante transgeniche e di controllo. I dati si riferiscono al valore medio di tre esperimenti con il relativo errore standard.

3.9.2 Infezione su spiga con *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum*

Infezione con *Bipolaris sorokiniana*

Il fungo *Bipolaris sorokiniana* è in grado di infettare non solo il tessuto fogliare (Fig.37)ma anche gli organi fiorali del frumento (Fig.37) (Kumar et al 2002, Clay et al 1997).

In questo caso è stato effettuato un unico esperimento su tre linee: la J82-200; la J82-23a e la MJ7-4a utilizzando, per ciascuna di esse, 15 piante positive contenenti il transgene e 15 piante controllo per tre delle linee analizzate. Due spighe centrali di una spiga per pianta in stadio Zadoks 68 sono state inoculate utilizzando 6000 conidi in un volume finale di 20 µl dello stesso ceppo utilizzato per le infezioni fogliari.

Dopo l'inoculo le spighe sono state incluse in buste di plastica per mantenere un elevato tenore di umidità e per creare un effetto ombreggiante. Le buste sono state rimosse dopo 48 ore dall'inoculo ed i sintomi misurati durante tutto il corso dell'infezione.

Per quanto riguarda la linea J82-200 sia le piante transgeniche sia il controllo hanno mostrato i primi sintomi di infezione al terzo giorno post-inoculo, al 6° giorno le spighe inoculate ingiallivano e nella linea controllo i sintomi si diffondevano molto rapidamente verso l'apice della spiga, raggiungendo il 12,7 % all'8° giorno e il massimo del 18,7 % al 23° giorno, mentre nella linea transgenica la diffusione del sintomo è risultata meno rapida e contenuta nell'intorno delle spighe inoculate: all'8° giorno, infatti ha raggiunto solamente il 7,5 % di diffusione del sintomo con un culmine del 15% al 23° giorno (Fig. 37; Fig. 38 A; Fig.39).

Comportamento analogo è stato osservato per la linea J82-23a dove i sintomi compaiono a 2 giorni post- inoculo ma sin dal 5° giorno si nota un sostanziale rallentamento della progressione della malattia nella linea transgenica che culmina al 21° giorno con una percentuale di spighe infettate pari al 7% nelle piante T e 11% nel controllo (Fig.37; Fig. 38 B; Fig.39). Per quanto riguarda la linea MJ7-4a le due linee hanno andamento identico dal 2° giorno fino al 4°, poi c'è un rapido incremento nella diffusione dei sintomi nella linea controllo fino ad arrivare al 21° giorno in cui la sintomatologia si attesta intorno al 20,5 % la linea transgenica e 27,8 % per la linea controllo (Fig. 37; Fig.38 C; Fig.39).

Da questi dati è possibile calcolare il livello di protezione della PVP GIP2 che risulta essere al 21° giorno pari a 19,7% per la linea J82-200, 35,72% per la J82-23a, 26,18% per la MJ7-4a.

La riduzione nello sviluppo della malattia lungo la spiga è risultato significativo applicando il test t di student al set di dati disponibili ($P \leq 0,05$) per la linea J82-23a e per la linea MJ7-4a sia a 8 che 23 giorni post-inoculo; per la linea J82-200 il dato è risultato significativo solo per il dato corrispondente alle 23 giorni.

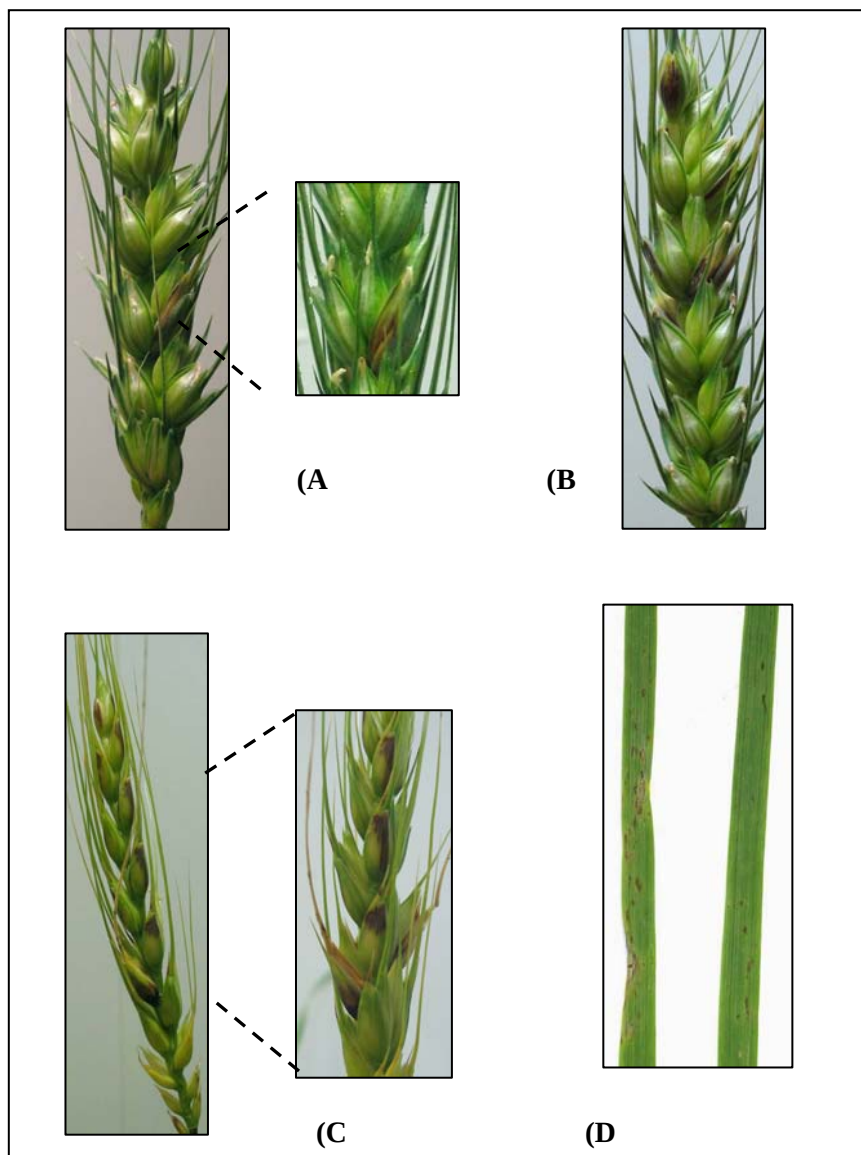


Fig.37 Rappresentazione della sintomatologia sulla linea J82-23 a seguito di infezione con *Bipolaris sorokiniana*. I sintomi sono rappresentativi di una pianta transgenica esprime la PvPGIP2 (AeB) rispettivamente 2 e 21 giorni post inoculo; **(C)** di una pianta di controllo 21 giorni dopo l'inoculo; **(D)** sintomi rilevati 72 ore dall'inoculo su foglia di una pianta transgenica, a sinistra, e di controllo a destra.

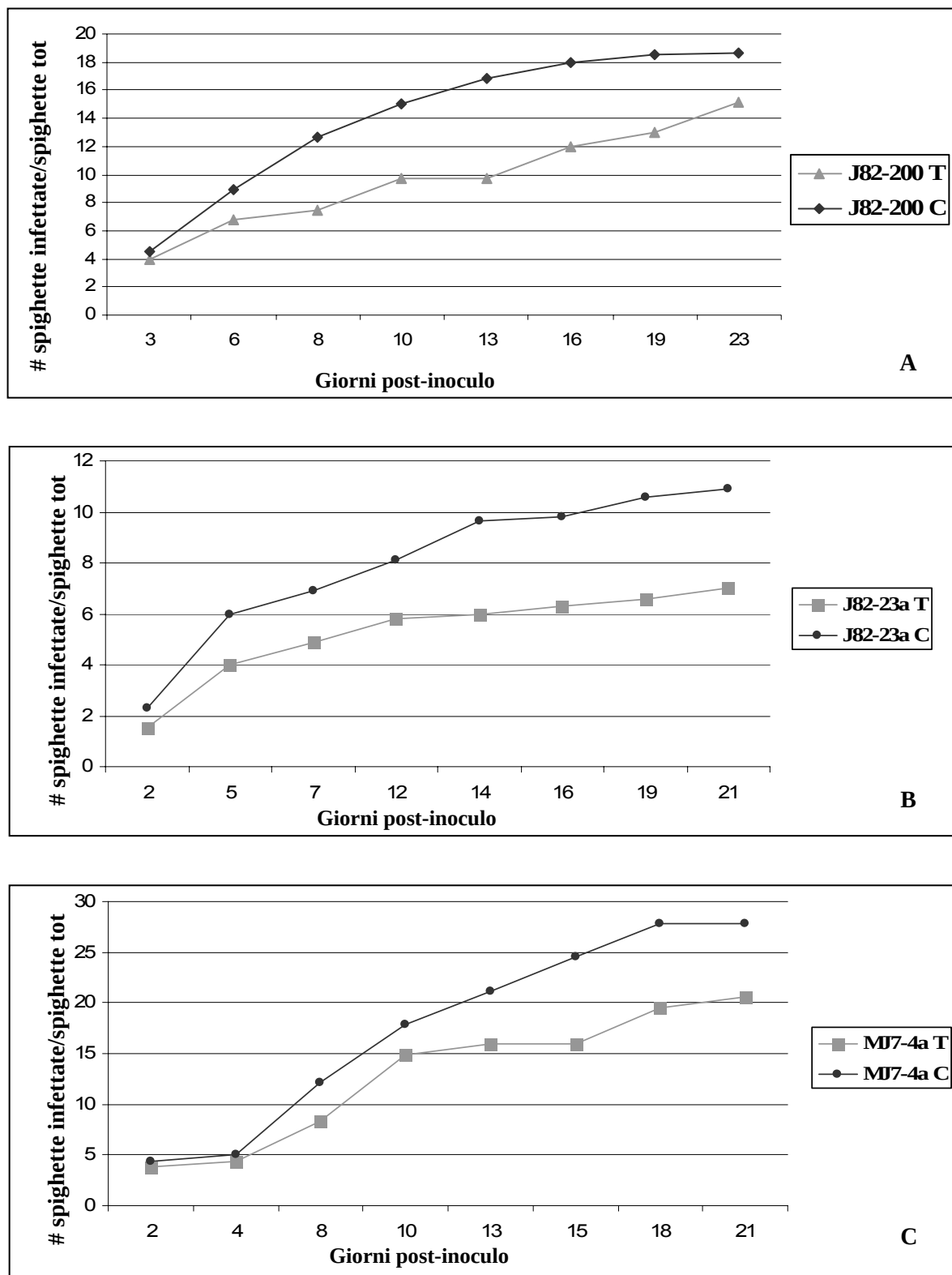


Fig.38 Progressione sintomatica espressa come spighetta infettata/ spighette totali*100 a seguito di infezione con *B. sorokiniana*. **(A)** J82-200; **(B)** J82-23°; **(C)** MJ7-4a. In grigio è indicata la linea transgenica (T), in nero la linea Controllo(C).

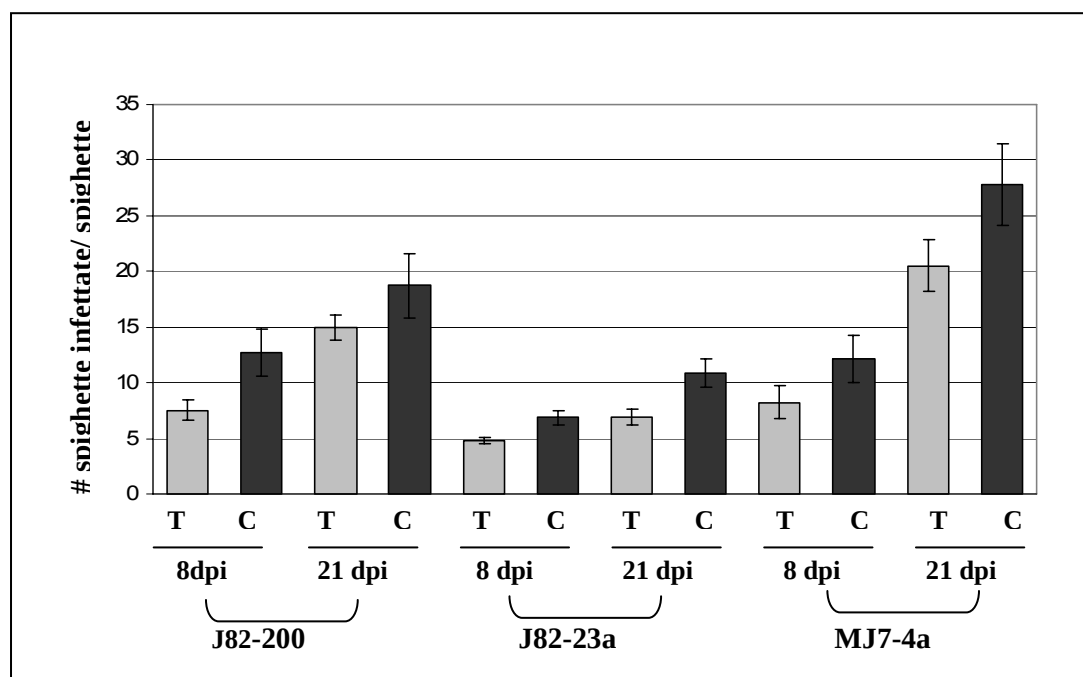


Fig.39 Grafico dei valori medi di spighe infettate rilevate 8 e 21 giorni dopo l'inoculo con *B. sorokiniana* in piante transgeniche e di controllo. I dati si riferiscono al valore medio di un unico esperimento con il relativo errore standard.

Infezione con *Fusarium graminearum*

Per gli esperimenti di infezione con il ceppo 3287 di *F. graminearum* è stata presa in esame soltanto la linea J82-23a.

Per gli esperimenti di infezione sono stati utilizzati 1000 conidi in 20 µl di soluzione per inoculare due spighe centrali opposte. Gli inoculi sono stati effettuati sulle piante transgeniche, di controllo nello stadio di crescita Zadoks 68 (Bai 2001) (Fig.40).

Nell'unico esperimento effettuato sono state utilizzate 15 piante transgeniche e 15 piante controllo. Dopo l'inoculo, le spighe sono state incluse in buste di plastica per mantenere un elevato tenore di umidità e per creare un effetto ombreggiante. Le buste sono state rimosse dopo 48 ore dall'inoculo ed i sintomi misurati durante tutto il corso dell'infezione con le modalità riportate da Bai 2001. La sintomatologia è caratterizzata dal precoce ingiallimento della spiga a partire dal punto di inoculo e dalla presenza di fruttificazioni fungine alla base delle glume, verso l'apice della spiga, con successivo disseccamento della stessa come indicato in figura 41.

I sintomi sono stati valutati come il numero di spighe infettate sul numero di spighe totali espresso in percentuale; le due spighe su cui è stato effettuato l'inoculo sono state incluse nel conteggio. I sintomi sono visibili in media da due giorni dopo l'inoculo, esclusivamente nei punti di inoculo, sia nelle piante positive, esprimenti la proteina transgenica che in quelle negative di controllo.

L'analisi della progressione dei sintomi ha evidenziato una significativa riduzione ($P=0,05$) nelle piante transgeniche sia della percentuale di spighe infettate sul totale (Figura 42 A), sia una riduzione nella velocità di propagazione del sintomo lungo la spiga (Figura 42 B).

Analizzando, infatti, la progressione della malattia nel tempo è possibile osservare che fino al 6° giorno post inoculo, la progressione della malattia è uniforme nelle piante transgeniche, e nel controllo; dall'8° giorno in poi nelle piante di controllo si ha il 3% in più di spighe infettate rispetto alle transgeniche, mentre dal 10° giorno in poi la differenza tra le piante transgeniche e di controllo si attesta intorno al 5% (Fig. 41; Fig 42 B).

Dall'analisi dei dati ottenuti è possibile calcolare la protezione riscontrata nelle piante transgeniche imputabile alla sovra-espressione della PvPGIP2 assumendo pari al 100% il valore dei sintomi riscontrati nelle piante di controllo, e calcolando proporzionalmente la riduzione dei sintomi nelle piante transgeniche.

Tale valore è del 26% e corrisponde alla protezione presumibilmente conferita dalla PvPGIP2.

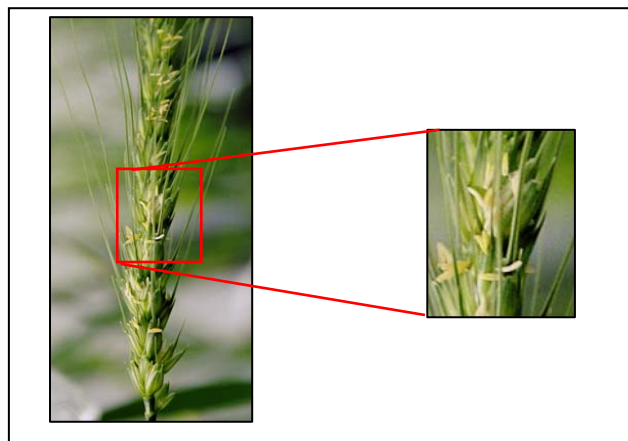


Fig.40 Spiga di frumento transgenico nello stadio di crescita Zadoks stage 68

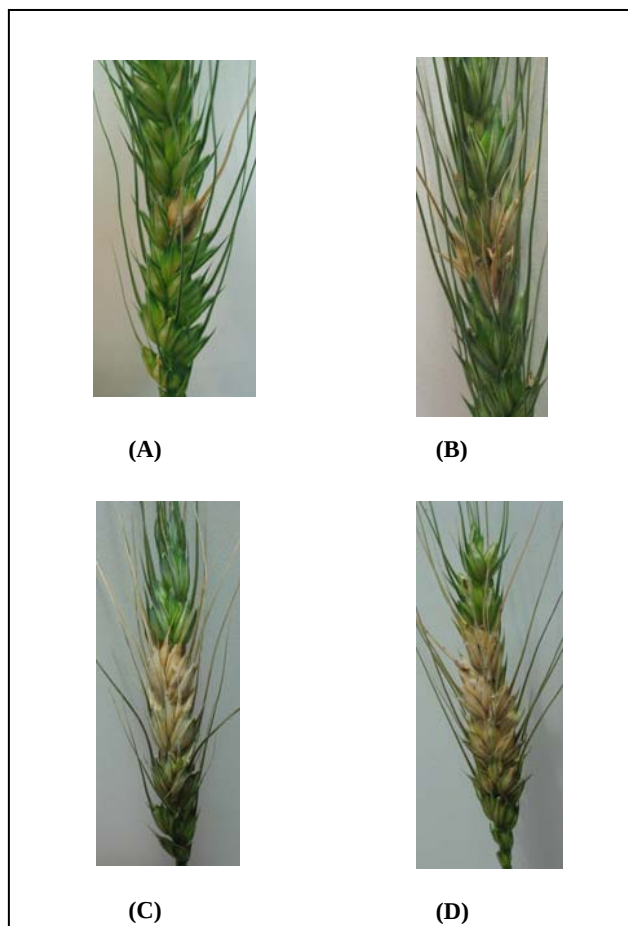


Fig.41 Rappresentazione della sintomatologia sulla linea J82-23 a seguito di infezione con *Fusarium graminearum*. I sintomi sono rappresentativi di una pianta transgenica esprimente la PvPGIP2 (AeB) rispettivamente 3 e 21 giorni dopo l'inoculo e di una pianta di controllo (C e D) 3 e 21 giorni dopo l'inoculo.

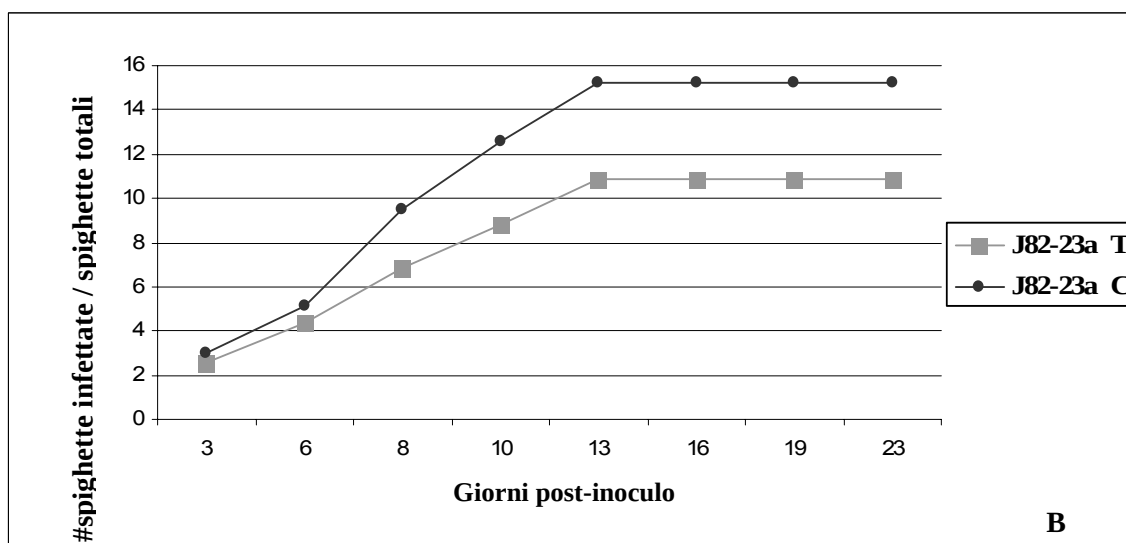
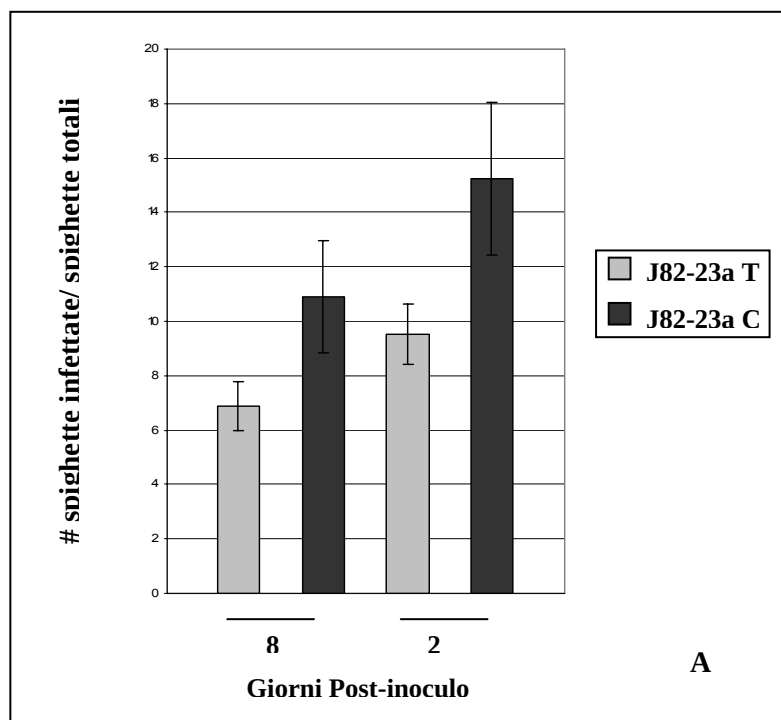


Fig.42 A Progressione dei sintomi dopo 8 e 21 giorni dall'inoculo con *F. graminearum* in spighe della linea J82-23a, I dati si riferiscono al valore medio del singolo esperimento con il relativo errore standard.
B Progressione sintomatica nella linea transgenica J82-23a (T) in grigio e del controllo (C) in nero a seguito di infezione con *F. graminearum*.

3.10 Incrocio della linea J82-23a con la linea di frumento transgenico AGIV

Sulla base del singolo esperimento di infezione effettuati con *F. graminearum*, è stato possibile verificare un effetto protettivo della PvPGIP2. Tuttavia poiché nella patogenesi del *F. graminearum* le micotossine svolgono un ruolo fondamentale sono stati effettuati degli incroci tra la linea J82-23a e la linea transgenica AGIV al fine di combinare due fattori positivi, PvPGIP2 e Tri101, in un unico genotipo.

In F₁ sono stati ottenuti 8 semi dai quali è stato estratto il DNA e analizzato mediante PCR con oligonucleotidi specifici. La verifica della presenza del gene *Pvpgip2* è stata effettuata con le coppie 615F/853R, già utilizzate in precedenza, mentre il gene *Tri101* è stato identificato utilizzando le coppie Tri101F/Tri101R, sviluppate sulla base della sequenza del gene tricotecene 3-O-acetiltrasferasi (*Tri101*) del *Fusarium sporotrichioides* (numero di accessione AF127176) che produce un frammento di amplificazione di 500 bp. (Tabella 15; Fig. 43)

Tabella 15: Schema riassuntivo dell'analisi PCR sull'incrocio *Pvpgip2* x *Tri101*.

	<i>Pvpgip2</i>	<i>Tri101</i>
J82-23a x AG-1	-	-
J82-23a x AG-2	+	+
J82-23a x AG-3	+	+
J82-23a x AG-4	+	+
J82-23a x AG-5	+	-
J82-23a x AG-6	+	+
J82-23a x AG-7	+	-
J82-23a x AG-8	+	+

Tutti i semi sono stati autofecondati ottenendo la generazione F₂ e la generazione successiva verrà testata mediante prove di infezione nei confronti del patogeno *F. graminearum* e si potrà in questo modo valutare l'efficacia dell'azione sinergica dei due geni.

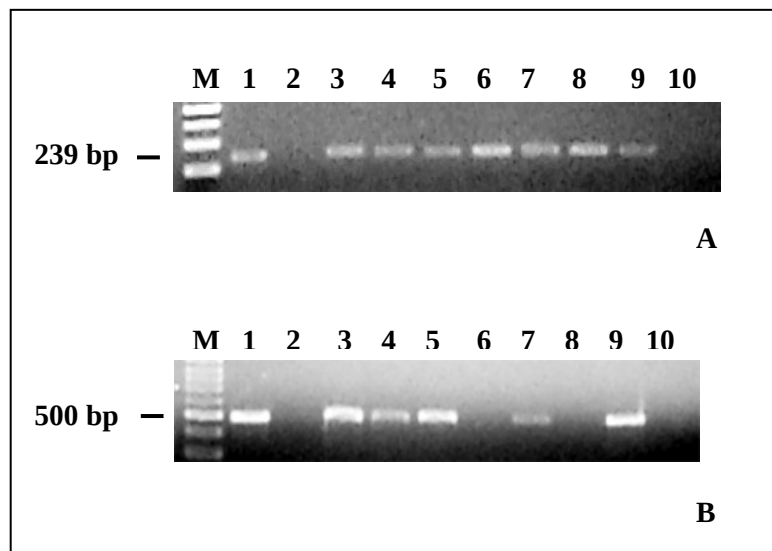


Fig.43 Gel di agarosio all' 1.5% dei prodotti di amplificazione ottenuti dai semi F1 dell'incrocio tra la linea J82-23a e la linea transgenica AGIV. **A)** Prodotti PCR ottenuti utilizzando i primers specifici per il gene *Pvpgip2*, 615F/853R che danno un frammento di amplificazione di 250bp. **(M)** Marker 100 bp ladder plus; **(1)** DNA genomico della linea J82-23a; **(2)** J82-23a x AG-1; **(3)** J82-23a x AG-2; **(4)** J82-23a x AG-3; **(5)** J82-23a x AG-4; **(6)** J82-23a x AG-5; **(7)** J82-23a x AG-6; **(8)** J82-23a x AG-7; **(9)** J82-23a x AG-8; **(10)** Controllo negativo rappresentato dall'acqua; **B).** Prodotti PCR ottenuti utilizzando i primers specifici per il gene *Tri101*: Tri101F/Tri101R. **(M)** Marker 100 bp ladder plus; **(1)** AGIV; **(2)** J82-23a x AG-1; **(3)** J82-23a x AG-2; **(4)** J82-23a x AG-3; **(5)** J82-23a x AG-4; **(6)** J82-23a x AG-5; **(7)** J82-23a x AG-6; **(8)** J82-23a x AG-7; **(9)** J82-23a x AG-8; **(10)** Controllo negativo rappresentato dall'acqua.

Discussione

4. DISCUSSIONE

Le malattie delle piante sono responsabili ogni anno di notevoli perdite di prodotto che, nel caso del *Fusarium graminearum*, uno dei patogeni chiave della coltura del frumento, si aggirano a livello mondiale intorno al 50%.

Vista l'importanza del frumento nel panorama mondiale, lo studio dell'interazione pianta-microrganismo fitopatogeno ha senza dubbio un ruolo fondamentale per lo sviluppo di nuove varietà resistenti.

Negli ultimi anni sono state prodotte numerose linee di piante di frumento transgeniche sovraesprimenti diversi geni di difesa o resistenza allo scopo di incrementare la risposta difensiva nei confronti dei patogeni chiave del frumento come *Blumeria graminis*, agente causale dell'oidio (Alpeter et al. 2005, Bliffeld et al., 1999), *Puccinia recondita*, agente causale della ruggine bruna (Serazetdinova et al., 2005) e *F. graminearum* (Chen et al 1999, Okubara et al 2002, Anand et al. 2003). In tutti i casi riportati è stata osservata una netta riduzione dell'instaurarsi della malattia.

La resistenza delle piante può esplicarsi a vari livelli ma la parete delle cellule vegetali costituisce l'ostacolo principale di gran parte dei funghi fitopatogeni sia nella fase di penetrazione sia nella colonizzazione del tessuto. Il patogeno, a tal fine, produce degli enzimi in grado di degradare la parete delle cellule vegetali; tra queste le endo-poligatturonasi rivestono un ruolo fondamentale anche perché in molti casi, la loro azione è prioritaria rispetto ad altri enzimi degradativi. L'importanza delle PG nella patogenesi è stata dimostrata per i funghi *Botrytis cinerea* (Ten Have et al., 1998), *Alternaria citri* (Isshiki et al., 2001) e *Claviceps purpurea* (Oeser et al., 2002), e per i batteri *Agrobacterium tumefaciens* (Rodriguez-Palenzuela et al., 1991) e *Ralstonia solanacearum* (Huang and Allen, 2000).

La PGIP (Inibitore Proteico della Poligatturonasi) è una proteina presente nella parete delle cellule vegetali che è in grado sia di legare specificamente e reversibilmente le PG fungine rallentandone l'attività, sia di rilasciare oligatturonidi attivi nell'indurre le risposte di difesa delle piante (De Lorenzo et al., 2001).

I risultati incoraggianti che dimostrano che la sovraespressione di PGIP in piante transgeniche di pomodoro (Powell et al., 2000), *Arabidopsis* (Ferrari et al., 2003), vite (Aguero et al 2005) e tabacco (Manfredini et al 2005) porta ad una riduzione dei sintomi dovuti alla crescita del fungo *Botrytis cinerea* è senz'altro un ottimo indizio per perseguire questa strategia al fine di incrementare le capacità di difesa delle piante. Tale approccio risulta particolarmente interessante soprattutto in considerazione del fatto che la sovraespressione di una singola PGIP con una elevata efficienza d'inibizione potrebbe risultare efficace per proteggere la pianta

contro un ampio numero di patogeni, ovvero di tutti quelli che producono PG durante la fase di colonizzazione.

A questo proposito le analisi di specificità di riconoscimento hanno dimostrato chiaramente che la PvPGIP2 è l'inibitore più efficace nei confronti delle diverse PG fungine testate (D'Ovidio et al., 2004). Considerando inoltre che questa proteina viene espressa in tutti i tessuti durante il normale ciclo di crescita delle piante di fagiolo (Roberti et al 2003), è stato ritenuto appropriato il suo utilizzo in esperimenti di trasformazione genetica finalizzati a potenziare costitutivamente le risposte di difesa del frumento nei confronti di funghi patogeni che producono PG durante la fase di infezione e colonizzazione del tessuto ospite. Inoltre, anche se il contenuto di pectina della parete cellulare delle graminacee è in generale minore di quello riscontrato nelle dicotiledoni, esso presenta una chiara distribuzione tessuto-specifica. Infatti, è stato recentemente dimostrato che le pareti cellulari dell'ovario della segale sono ricche in pectina e si ritiene che questa caratteristica sia di fondamentale importanza per il naturale processo infettivo della *Claviceps purpurea*, per la quale è stato dimostrato che la PG costituisce un fattore di patogenicità.

Per gli esperimenti di trasformazione genetica sono stati scelti come espianti gli embrioni immaturi di piante di frumento della cv. Bobwhite prelevati da 10 a 18 giorni dopo l'antesi, in quanto questo rappresenta il momento più idoneo per avere un'alta frequenza di formazione di callo embriogenico e per avere un'elevata rigenerazione di germogli primari (Shimada and Yamada 1979, Pastori et al 2001, Weeks et al 2001). Nel nostro caso gli esperimenti hanno dato un'efficienza di trasformazione variabile tra lo 0,59 e lo 0,98%, ottenendo un numero di linee (T0) rigenerate su terreno selettivo pari a 32 nell'esperimento J82 e 64 nell'esperimento MJ.

L'efficienza di trasformazione del frumento ottenibile con il metodo del bombardamento biolistico è altamente variabile ed è influenzata da numerosi fattori quali la varietà utilizzata, l'età della pianta donatrice dell'espianto la distanza dallo sparo e il tipo di costrutto utilizzato. Tutti questi parametri sono stati ottimizzati utilizzando il protocollo riportato da Weeks et al 2003. Come atteso, inoltre, le linee transgeniche ottenute hanno mostrato differenti livelli di espressione del transgene. Questa variazione è in gran parte attribuibile al numero di copie del transgene inserite ed alla posizione genomica in cui il transgene va ad inserirsi, generando quello che viene definito "effetto di posizione".

Le linee ottenute dalla rigenerazione in terreno selettivo, che sono rimaste vitali dopo un breve periodo di adattamento in serra e fertili, sono state testate per la presenza del gene *Pvpgip2*, riducendo il numero delle linee ottenute a 11 nel caso delle J82 e 8 nel caso delle MJ.

Queste linee sono state moltiplicate e portate in generazione T2 che è stata testata sia per la presenza del transgene che per l'attività della proteina codificata. Dall'analisi dell'attività inibitoria è risultato che alcune linee non solo erano positive per la presenza del gene *Pvpgip2*

ma che il suo prodotto proteico manteneva la sua tipica capacità inibitoria, anche se con livelli variabili di espressione tra le diverse linee. Al contrario alcune linee come la J82-100-8 pur essendo portatrici del transgene, non mostravano alcuna attività inibitoria nei confronti della PG di *F. moniliforme*.

L'analisi Southern blot di queste linee ha consentito di stabilire la presenza di copie multiple in tutte le linee e il verificarsi di eventi di riarrangiamento a carico del transgene. Inoltre, l'elevato numero di frammenti di ibridazione nella linea J82-100-8, consente di ipotizzare che la sua mancanza di attività inibitoria sia dovuta ad un evento di silenziamento del transgene probabilmente causato dall'elevato numero di copie di *Pvpgip2* inserite.

L'analisi Southern non ci consente di stabilire se le copie del transgene *Pvpgip2* siano inserite in un unico locus o in più loci ma l'atteso è che esse siano localizzate in un unico punto del genoma come è stato già osservato, mediante ibridazione in situ, su una linea di frumento sovraesprimente una glutenina a basso peso molecolare ottenuta mediante bombardamento biologico. In questo caso le diverse copie del transgene sono state localizzate in un unico sito di inserzione nella regione pericentromerica del braccio corto del cromosoma 5D (Carozza et al. 2005). Questa ipotesi è anche supportata dalla presenza nella generazione T3 di tutte le linee transgeniche del gene *bar*. Questa co-segregazione dei geni *bar* e *Pvpgip2* suggerisce infatti che probabilmente l'inserimento dei due geni è avvenuto in siti adiacenti, come riportato anche da Stoger et al (1998) per altri geni.

Fenotipicamente le piante sovra-esprimenti la PvPGIP2 sono simili alle piante di controllo non transgeniche, così come la loro modalità di germinazione e il numero di spighe e spighe per pianta. Le uniche differenze riscontrate riguardano delle lievi differenze nella fase di estrusione delle antere che è ritardata nelle piante transgeniche ed avviene quando l'abbozzo di cariosside è già in fase di formazione. Tuttavia, questa differenza non sembra imputabile alla sovra-espressione della PvPGIP2 in quanto un risultato analogo è stato osservato in linee transgeniche di frumento tenero prodotte con metodo analogo ma sovraesprimenti un gene per le glutenine a basso peso molecolare (Masci et al. 2003; Scossa et al., 2006)

Analizzando l'espressione delle 6 linee caratterizzate è stato dimostrato che la sovra-espressione della PvPGIP2 non altera l'espressione dei geni *pgip* endogeni ed in ciascuna di esse la proteina transgenica mantiene le peculiari specificità di riconoscimento e la corretta localizzazione apoplastica, come dimostrano le elevate attività inibitorie e gli specifici segnali di ibridazione del Western blotting riscontrati nei liquidi extra-cellulari ottenuti dagli esperimenti di infiltrazione. Inoltre, i saggi di attività effettuati su tessuti diversi dimostrano che la PvPGIP2 è accumulata nelle radici, nel colletto, nel fusto, nelle foglie e negli organi fiorali della spiga, quali ovari e glume. Questo risultato è di particolare importanza in considerazione delle specifiche modalità di infezione del *Fusarium graminearum* che avviene a livello delle spighe.

Nonostante questo uniforme comportamento, le 6 linee presentano livelli e stabilità di espressione differenti. In particolare, la linea J82-23a è tra quelle che esprime in modo più abbondante la proteina transgenica ed insieme alla linea J82-46c è quella che presenta un'espressione stabile nel corso delle generazioni; diversamente le linee MJ7-4 e J82-200, sono quelle che mostrano una notevole variabilità di espressione nel corso delle generazioni. In queste linee, la progenie di una stessa generazione può presentare individui che mantengono lo stesso livello di attività della pianta madre oppure un livello più basso o nullo. Le attività di queste ultime rimangono tali nelle generazioni successive, mentre la progenie di quelle piante che presentano lo stesso livello di attività della pianta madre possono andare incontro allo stesso fenomeno di variabilità descritto. Questa osservazione potrebbe spiegare la mancanza del segnale di ibridazione negli esperimenti di Western blotting per le linee MJ7-4, J82-200 e MJ5-1, anche se ciò potrebbe essere dovuto ad un differente comportamento tra le linee per quanto riguarda l'accumulo di PvPGIP2 nell'apoplasto, come sembrerebbe verificarsi per la linea J82-46c, il cui estratto proteico totale presenta una elevata attività inibitoria.

Una variabilità di espressione del transgene è stata riscontrata anche in studi precedenti riguardanti piante transgeniche prodotte mediante metodo biolistico, dove l'analisi dell'espressione del gene marcatore *bar* ha evidenziato una perdita graduale dell'espressione nel corso di tre generazioni successive (Cannel et al 1999). E' possibile che il pattern e i livelli di espressione del transgene dipendano dal particolare gene, dal costrutto, ed in particolare dal promotore, dal genotipo ricevente e anche dalla posizione in cui si va ad inserire il transgene (Shewry et al. 2005). In alcuni casi è stato riportato che la minore stabilità dei livelli di espressione del transgene potrebbe essere correlata al numero di copie inserite durante l'evento di trasformazione, ossia un maggior numero di copie posizionate nella regione centromerica, potrebbe determinare una maggiore instabilità di espressione del transgene (Howart et al 2005, Anand et al 2003a). Questa ipotesi trova in parte riscontro nell'analisi da noi effettuata sulla linea J82-100-8 dove la mancata espressione della PvPGIP2 è correlata con la presenza di un numero particolarmente elevato di inserzioni del transgene. Altri risultati, invece, non confermano questa corrispondenza tra elevato numero di copie e livelli bassi di espressione (Rooke et al 2003).

Uno dei primi risultati *in vivo* dell'efficacia dell'evento di trasformazione è stata la dimostrazione che le piante transgeniche di frumento hanno ampliato il loro spettro di specificità di riconoscimento nei confronti delle PG fungine, come dimostrato dalla loro capacità di riconoscere la PG di *Fusarium moniliforme*, diversamente da quanto osservato nelle piante di controllo non transgeniche dove la PGIP endogena non è in grado di inibire la PG di *F. moniliforme*.

Esperimenti condotti su fusti di piante transgeniche e di controllo, hanno dimostrato una riduzione dell'azione macerante della PG di *F. moniliforme* sui tessuti delle piante transgeniche,

come evidenziato dalla riduzione dei frammenti pectici rilasciati in seguito al trattamento con questo enzima. Tali risultati sono in accordo con quanto precedentemente riportato in porro, dove è stata dimostrata una stretta relazione tra l'attività *in vitro* della PGIP e la resistenza dei tessuti di porro all'azione macerante di differenti PG (Favaron et al 1997).

Gli evidenti effetti protettivi della PvPGIP2 transgenica sono stati confermati dagli esperimenti di infezione effettuati con *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum*. In questa serie di esperimenti è risultata chiara la correlazione tra sovraespressione della proteina transgenica e riduzione del sintomo della malattia. Questo risultato appare particolarmente accentuato nei confronti del patogeno *B. sorokiniana* dove, nelle tre linee prese in esame: J82-23a, J82-200, MJ7-4a, la riduzione nella sintomatologia riscontrata nelle foglie corrisponde rispettivamente al 49%, 47,2% e 46%, mentre nelle spighe oscilla tra il 19 e il 35 % a seconda delle linee prese in esame.

Il significativo incremento di resistenza del tessuto fogliare e delle spighe all'attacco di *B. sorokiniana* suggerisce che l'inibizione delle PG da parte della PGIP non previene lo stabilirsi dell'interazione pianta-patogeno ma, come atteso, influenza in modo rilevante le successive fasi di colonizzazione del tessuto ospite. Se questo effetto protettivo è dovuto alla sola azione inibitoria della PGIP nei confronti delle PG fungine o anche ad una più efficace induzione dei meccanismi di difesa della pianta, grazie al maggior accumulo di oligogalatturonidi che si dovrebbe realizzare nelle piante transgeniche, non è stato ancora indagato ma la recente dimostrazione dell'efficacia degli oligogalatturonidi nel proteggere la vite dalla *Botrytis cinerea* (Aziz et al., 2004) suggerisce che l'incremento di resistenza riscontrato può essere dovuto alla combinazione dei due fattori protettivi..

Dai dati ottenuti su una singola linea (J82-23a) risulta, invece, che l'efficacia protettiva della PvPGIP2 contro il *F. graminearum*, non raggiunge gli elevati livelli riscontrati contro il *B. sorokiniana* ma si aggira intorno 26%. E' probabile che questa minore azione protettiva della PvPGIP2 sia dovuta al meccanismo stesso di invasione del *F. graminearum* in cui è stato dimostrato che la produzione di fitotossine gioca un ruolo fondamentale nel processo di patogenesi. Infatti, nel caso del *F. graminearum* e *F. culmorum*, i due principali agenti causali della fusariosi, è riportato che le micotossine tricoteceni da essi prodotte, tra cui il DON (deossivalenolo), costituiscono un fattore di notevole importanza non solo poiché tossiche se ingerite dagli animali, ma anche perché rappresentano un fattore di virulenza post-infezionale (Proctor et al 1995, Proctor et al 2002).

Sulla base di questa conoscenza abbiamo intrapreso un programma di piramidizzazione genica che coinvolge le linee sovra-esprimenti la PvPGIP2 e le linee AB156 e AGIV (Okubara et al 2002), sovraesprimenti il transgene *FsTri101*, il cui prodotto proteico inibisce l'attività tossica delle micotossine trasferendo un gruppo acetile al gruppo idrossilico in C3 dei tricoteceni.

Secondo questa strategia l'aggressione del patogeno dovrebbe essere contrastata sin dai primi stadi di infezione attraverso un rallentamento dell'azione macerante della PG e una ridotta tossicità delle micotossine. L'eventuale effetto sinergico di queste due componenti verrà verificato contro *F. graminearum* sulla progenie degli incroci prodotti.

Conclusioni

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno consentito di stabilire che la PGIP può determinare un significativo contributo alla risposta di resistenza in frumento contro i patogeni fungini che producono PG durante il processo di infezione e colonizzazione del tessuto ospite. Inoltre, sulla base delle conoscenze acquisite sono stati prodotti dei genotipi con caratteristiche di difesa additive che rappresentano degli utili materiali per verificare la risposta di difesa contro quei patogeni che producono micotossine durante la fase di infezione.

Nello specifico i risultati ottenuti hanno consentito di stabilire che:

- L'efficienza di trasformazione ottenuta si aggira intorno all'1%
- Le linee prodotte (25) presentano un numero multiplo di copie del transgene che nella linea J-82-100-8 è particolarmente elevato e correlato alla mancata espressione della PvPGIP2.
- Nelle sei linee caratterizzate la PvPGIP2 mantiene le proprie peculiari caratteristiche di riconoscimento conferendo a queste un ampliamento nel loro spettro di inibizione delle PG, particolarmente evidente nei confronti della PG di *F. moniliforme* che non viene normalmente riconosciuta dalle PGIP endogene.
- Le linee transgeniche presentano livelli di espressione variabile che in alcune di esse (J82-200, MJ7-4a e MJ5-1) non sono stabili nel corso delle generazioni.
- Le linee transgeniche non presentano variazioni del fenotipo durante tutta la fase di crescita e sviluppo ad esclusione di un ritardo nelle emissioni delle antere che non sembra tuttavia correlato con la presenza e/o sovra-espressione del transgene.
- La PvPGIP2 transgenica risulta essere correttamente localizzata nell'apoplasto, così come si verifica in fagiolo che è la sua specie di origine.
- *In vivo* la PvPGIP2 transgenica interagisce con la PG di *F. moniliforme* e ne limita l'attività idrolitica sui tessuti delle piante transgeniche.
- Le linee J82-200, J82-23a e MJ7-4a hanno mostrato una significativa riduzione della sintomatologia causata da *Bipolaris sorokiniana*, che si attesta intorno al 45 % per le infezioni fogliari e rispettivamente intorno al 19,7%, 35% e 27% per le infezioni sulla spiga. Inoltre tale protezione sembra essere correlata con i livelli di espressione del transgene.
- La linea J82-200 mostra una riduzione dei sintomi causata da *F. graminearum* pari al 26%.
- Sono state prodotte delle linee di frumento contenenti i transgeni *Pvpgip2* e *Tri101*, il cui prodotto proteico inibisce l'attività tossica dei tricoteceni, che saranno utili per verificare la risposta di resistenza contro i patogeni, tra cui il *F. graminearum*, che producono PG e micotossine durante la fase di infezione.

Bibliografia

6. BIBLIOGRAFIA

Abu-Goukh, A.A., Strand, L.L. and Labavitch, J.M., (1993). Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of “Bartlett” pear fruit. *Physiological Plant pathology* 23:101-109.

Ahmad A., Zhong H., Wang W.L., Sticklen, M.B., (2002). Shoot apical meristem: In vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 163–167.

Agrios G.N., (1997). *Plant pathology*. Academic press., San Diego

Aguero CB, Uratsu SL, Greve C, Powell AT, Labavitch JM, Meredith CP, Dandekar A.M., (2005). Evaluation of tolerance to Pierce’s disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* 6: 43–51

Alber T., (1992). Structure of leucine zipper. *Curr. Opin. Gent. Dev.* 2: 205-210.

Altpeter F., Vasil, V. Srivastava V., Stoger E., Vasil I.K., (1996a). Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants, *Plant Cell Rep.* 16: 12-17.

Altpeter F., Vasil V., Srivastava, V and Vasil I. K., (1996b). Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nat. Biotech.* 14: 1151-1159.

Altpeter F., Diaz I., McAuslane H., Gaddour K., Carbonero P., Vasil I.K., (1999). Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe, *Mol. Breed.* 5: 53-63.

Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix P.J., Fauquet C., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen TT., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D A., Stoger E., Taylor N. and Visser R., (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding* 15: 305–327.

Anand A., Trick H.N., Gill B.S. and Muthukrishnan S., (2003a). Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant technology journal* 1:241-251.

Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., and Muthukrishnan, S., (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. J. Exp. Bot. 54:1001-1111.

Annis S.L., Goodwin P.H., (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi, European Journal of Plant Pathology 103: 1– 14.

Aziz A., Heyraud A., Lambert B.,(2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. Planta 218 (5):767-774.

Bach E.E., Barros B.C, and Kimati H., (2003). Induced resistance against *Bipolaris bicolor* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by Xanthan Gum and heat Inactivated Conidial suspension. J. Phytopathology 151: 141-418.

Baker B., Zambryski P., Staskawicz B. and Dinesh-kumar S.P., (1997). Signaling in plant microbe interactions. Science 276: 726-733.

Bai G. H. (2001).Deoxivalenol- nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. Mycopathologia 153: 91–98.

Barro F., Rooke L., Bekes F., Gras P., Tatham A.S., Fido R., Lazzeri P.A., Shewry P.R., Barcelo P., (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties, Nat. Biotech. 15: 1295/1299.

Barro F., Barcelo P.A., Lazzeri P.R., Shewry A., Martin J., Ballesteros, (2002). Field evaluation and agronomic performance of transgenic wheat, Theor. Appl. Genet.: Published online 13 September 2002 (DOI 10.1007/s00122-002-0996-z).

Bailey J.A., O'Connell R.J., Pring R.J., Nash C., (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species, in: J.A. Bailey, A. Jeger (Eds.), Colletotrichum Biology, Pathology and Control, CAB International, Wallingford, Oxon (UK), pp. 88–120.

Becker D., Brettschneider R., Lorz H., (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue, Plant J. 5:299-307.

- Bent, (1996). Plant disease resistance genes : function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771
- Beri S., Potrykus I., Futterer J., (2000). Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat, *Theor. Appl. Genet.* 100 755-763.
- Bishop, J.G., (2005). Directed mutagenesis confirms the functional importance of positively selected sites in polygalacturonase inhibitor protein. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1531–1534.
- Blechl AE and Anderson OD., (1996). Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat Biotechnol.* 14(7): 875-879.
- Bliffeld M., Mundy J., Potrykus I., Futterer J., (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease, *Theor. Appl. Genet.* 98: 1079-1086.
- Blumenkrantz N and Asboe-Hansen G., (1973). New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry* 54: 484-89.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R and Zimmerlin, A., (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res*, 23: 517-532.
- Bourdon V., Ladbroke Z., Wickham A., Lonsdale D., Hardwood W., (2002). Homozygous wheat plants with increased luciferase activity do not maintain their high level of expression in the next generation, *Plant Sci.* 163: 297-305.
- Brederode FT and Linthorst HJ, (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* 17(6):1117-25.
- Bradley. D.J., Kjellbom, P and Lamb, C.J., (1992). Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
- Carozza R, Scossa F., Masci S., D'Ovidio R., (2005). Fish-based physical mapping of a low-molecular-weight glutenin subunit transgene insertion in a bread wheat line over-expressing the transgenic subunit. *Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*. B28

Cervone, F., De Lorenzo, G., Salvi, G. and Camardella, L., (1986). Molecular evolution of fungal polygalacturonase. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogenic Interactions*, NATO ASI Series, Vol H1, Bailey, J. (eds), pp. 385-392. Springer-Verlag, Berlin, FRG.

Cervone, F., De Lorenzo, G., Degrà, L., Salvi, G. and Bergami, M., (1987) Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris*. L. *Plant Physiol.* 85: 631-637.

Cervone, F., Hahn, M.G., De Lorenzo, G., Darvill, A. and Albersheim, P., (1989). Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 90: 542-548.

Cervone F., De Lorenzo G., Pressey R., Darvill A.G., Albersheim P., (1990). Can *Phaseolus vulgaris* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* 29:447-449.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward M.W., Prasher D.C., (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263 802/805.

Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F. and De Lorenzo, G., (1997). Perception of fungal elicitors and signal transduction. In *Signal Transduction in plants*. P.Aducci (ed.). Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.

Chang T.T. Konzak C.F., Zadoks J.C., (1974). A decimal code for the growth stages of cereal. *Weed Research* 14: 415-421.

Chen W.P., Gu X., Liang G.H., Muthukrishnan S., Chen P.D., Liu D.J., Gill B.S., (1998). Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1296–1306.

Chen W.P., Chen P.D., Liu D.J., Kynast R., Friebe B., Velazhahan R., Muthukrishnan S., Gill B.S., (1999). Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene, *Theor. Appl. Genet.* 99: 755-760.

Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W., Wan, Y.C., (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971–980.

Cheng, M., Hu, T.C., Layton, J., Liu, C.N., Fry, J.E., (2003). Desiccation of plant tissues post-Agrobacterium infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39, 595–604.

Cheng, M., Lowe, B.A., Spencer, T.M., Ye, X.D., Armstrong, C.L., (2004). Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40: 31–45.

Christensen A H and Quail P F, (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expressin of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Trans Res* 5:213-218.

Clay R.P, Bergmann C.W., Fuller M.S., (1997). Isolation and characterization of an endopolygalacturonase from *Cochliobolus sativus* and cytological study of fungal penetration in barley. *Phytopathology* 87 (11): 1149-1159.

Cook B.J., Clay R.P., Bergman C.W., Albersheim P. and Darvill A.G., (1999). Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differs in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 8: 703-711.

Dangl J.L and Jones J.D.G., (2001). Plant pathogens and integrated defence response to infection. *Nature* 411:826-833.

Desjardins AE, Hohn TM., (1997). Mycotoxins in plant pathogenesis .*Mol Plant-Microbe Interac.* 10: 147–152.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto , D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E and Ryals J, (1994). A central rolue in salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.

Delledonne, M. et al. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.

De Lorenzo G., Cervone F., Bellincampi D., Caprai C., Clark A.Y., Desiderio A., Devoto A., Forrest F., Leckie F., Nuss L., Salvi G., (1994). Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochemical Society Transactions* 22: 396-399.

De Lorenzo G, D'ovidio R and Cervone F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defence against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopat.* 39: 313-335

De Lorenzo, G., and Ferrari, S., (2002).. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant. Biol* 5 (4): 295-299.

Desiderio, A., Acrari, B., Leckie, F, Mattei, B., Salvi, G, Tigelaar, H., Van Roekel, J.S., Baulcombe, D.C., Melchers, L.S., De Lorenzo, G. and Cervone, F. (1997). Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 852-860.

Di Matteo A., Federici L., Mattei B., Salvi G., Johnson K.A., Savino C., De Lorenzo G., Tsernoglou D., (2003). The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat involved in plant defense. *Plant Biology* 100: 10124-10128.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L., (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*: 7: 1085-1097.

Doke, N (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall component of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressor of hypersensitive. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-367.

Doke, N., and Ohashi, Y., (1988). Involvement of an O₂- generating system in the induction of necrotic lesion on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 32: 163-175.

D'Ovidio R, Porceddu E., (1996). PCR-based assay for detecting 1B-genes for low molecular weight glutenin subunits related to gluten quality properties in durum wheat. *Plant Breeding*. 115(5): 413-415.

D'Ovidio R., Mattei B., Roberti S., Bellincampi D., (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et biophysica acta*: 1696:237-244.

Ellis J. And Jones D., (1998). Structure and function of proteins controlling strain specific pathogen resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 288-293.

Ellis, J., Dodds, P. and Pryor, T. (2000). The generation of plant disease resistance gene specificities. *TIPS* 5 (9): 373-379.

Eyal, Y. Sagee, O. and Fluhr, R. (1992). Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. *Plant Mol Biol*: 19 (4):589-99.

Favaron F., Castiglioni C. and Di Lenna P., (1993). Inhibition of some rot fungi polygalacturonases by *Allium cepa* L. and *Allium porrum* L. extracts. *Journal of Phytopathology* 139: 201-206.

Favaron F., Castiglioni C., D'Ovidio R. and Alghisi P. (1997). Polygalacturonase inhibiting proteins from *Allium Porrum* L. and their role in plant tissue against fungal endopolygalacturonases. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 403-417.

Favaron, F., (2001). Gel detection of *Allium porrum* polygalacturonase inhibiting protein reveals a high number of isoforms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58, 239–245.

Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D (2001). Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13425–13430

Federici L., Di Matteo A., Fernandez- Recio J., Tsernoglou D., Cervone F., (2006). Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity?. *Trends in Plant Science*. In Press.

Fernandez-Recio, J. Totrov M., Abagyan.R., (2003). ICM-DISCO docking by global energy optimization with fully flexible side-chains. *Proteins* 52, 113–117.

Fernandez-Recio, J. Totrov M., Abagyan.R., (2004). Identification of protein–protein interaction sites from docking energy landscapes. *J. Mol. Biol.* 335:843–865.

Fernandez-Recio, J., Totrov M., Skorodumovet C., Abagyan.R., (2005). Optimal docking area: a new method for predicting protein–protein interaction sites. *Proteins* 58: 134–143.

Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F and De Lorenzo G., (2003). Arabidopsis polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIP) are regulated by different signal transduction pathways during fungal infection. *Plant Cell*. 15: 93-106.

Fettig S., Hess D., (1999). Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines, *Transgenic Res.* 8 179-189.

Flavell, R.B.,(1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3490-3496.

Florr HH (1955). Host-parasite interaction in flax rust- its genetics and other implications. *Phytopatology* 45: 680-685.

Folling, L., Olesen, A., (2001). Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 20, 629–636.

Frediani, M., Cremonini, R., Salvi, G., Caprari, C., Desiderio, A., D'Ovidio, R., Cervone, F. and De Lorenzo, G. (1993). Cytological localization of the PGIP genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus Vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 87: 369-373.

Gaffney, T., Friederich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.

Gahakwa, D., S.B. Maqbool, X. Fu, D. Sudhakar, P. Christou & A. Kohli, (2000). Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. *Theor Appl Genet* 101: 388-399.

Gazendam I., Oelofse D., Berger D.K. High-level expression of apple PGIP1 is not sufficient to protect transgenic potato against *Verticillium dahliae*.(2004). *Physiological and Molecular plant pathology*. 65:145-155.

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

Hall, J.L., Flowers, T.J. and Roberts, R.M. (1981). *La Cellula Vegetale: Struttura e Metabolismo*. Zanichelli editore, Bologna.

Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.

He, G.Y., Lazzeri, P.A., Cannell, M.E., (2001). Fertile transgenic plants obtained from *Triticordeum* inflorescences by tissue electroporation. *Plant Cell Reports* 20, 67–72.

He G.Y., Rooke L., Steele S., Bekes F., Gras P., Tatham A.S., Fido R., Barcelo P., Shewry P.R., Lazzeri P.A., (1999). Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var durum) with highmolecular- weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality, *Mol. Breed.* 5: 377/386.

Heyser J.W., Nabors M.W, MacKinnon C., Dykes T.A., DeMott K.J., Kautzman D.C., Mujeeb-Kaji A., (1985). Long-term, highfrequency plant regeneration and the induction of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Z. Pflanzenzücht* 94: 218/233.

Holub, E.B., Beynon, L.J., and Crute, I.R. (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interaction between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 223-239.

Huang Q and Allen C (2000). Polygalacturonase are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57: 176-86.

Huber M., Hahn R., Hess D., (2002). High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Combi) by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection, *Mol. Breed.* 10 19-30.

Ingram, H.M., Power, J.B., Lowe, K.C., Davey, M.R., (1999). Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryos in wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57, 207–210.

Iozzo R.V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans-functional network of interactive proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 274: 18843-18846.

Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M, Yamamoto H (2001). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact* 14: 749-57

Janni M., Di Giovanni M., Roberti S., Dovidio R., (2006). Molecular characterization and chromosomal localization of genes encoding Polygalacturonase Inhibiting Proteins (PGIP) in wheat and rice. Theoretical and Applied genetics . Sottoposto per pubblicazione.

Jia J, Devos KM, Chao S, Miller TE, Reader SM, Gale MD (1996). RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of the wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat: Theor Appl Genet 92: 559-565.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A, Bevan M.W., (1987). GUS fusion: bglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, EMBO J. 6: 3901-3907.

Johal G.S. and Briggs S.P., (1992). Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize. Science 258: 985-987.

Johnston, D.J., Williamson, B., Mcmillan, G.P., (1993). The interactions in planta of polygalacturonases from *Botrytis cinerea* with a wall-bound polygalacturonase- inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. J. Exp. Bot. 45, 1837–1843.

Jones T.M., Anderson A.J., Albersheim P., (1972). Host – pathogen interactions: IV. studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* F. Sp. *lycopersici*, Physiological Plant Pathology 2:153–166.

Jones H.W., DohertyA, Wu H.,(2005). Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. Plant Methods 1:5. (<http://www.plantmethods.com/content/1/1/5>).

Jones, D. A. & Jones, J. D. G. (1997). The roles of leucine rich repeats in plant defences. Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol. 24, 90-167.

Jordan M.C., (2000). Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation, Plant Cell Rep. 19: 1069-1075.

Kajava A.V., (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. Journal of Molecular Biology 277: 519-527.

Khanna, H.K., Daggard, G.E., (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyaminesupplemented regeneration medium. *Plant Cell Reports* 21, 429–436.

Karunarante S., Sohn A., Mouradov, A. Scott J., Steinbiss H.H., Scott K.J., (1996). Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus, *Aust. J. Plant Physiol.* 23:429-435.

Keen N.T. (1990). Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24: 447-463.

Kemp G., Bergmann C.W., Clay R., Van der Westhuizen A., and Pretorius Z.A. (2003). Isolation of a Polygalacturonase-inhibiting Protein (PGIP) from Wheat. *The American Phytopathological Society MPMI* 16: 955-961.

King, D. et al. (2002). Use of amide exchange mass spectrometry to study conformational changes within the endopolygalacturonase IIhomogalacturonan- polygalacturonase inhibiting protein system. *Biochemistry* 41, 10225–10233

Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B., (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco, *Plant Physiology* 124:1027– 1038.

Knogge W. (1996). Fungal infection of plants. *Plant cell* 8, 1711-1722.

Kobe B.and Deisenhofer J. (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374: 183-186.

Kobe, B. and Kajava, A.V., (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725–732

Kornberg, A. and Horecker B.L.,(1955). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Method Enzymol.* 1, 323-327

Kramer,C., DiMaio,J., Carswell,G.K., Shillito, R.D., (1993). Selection of transformed protoplast- derived *Zea mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red. *Planta*190, 454-458.

Kuc, J (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32: 854-860.

Kunz, C., Islam, S.M.S., Berberat, J., Peter, S.O., Buter, B., Stamp, P., Schmid, J.E., (2000). Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *Journal of Plant Physiology* 156: 190–196.

Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan I S., Heinz Kogel A.K., (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3(4) , 185–195

Lafitte C., Barthe J.P., Montillet J.L., Touze' A. (1984)., Glycoprotein inhibitors of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to anthracnose, *Physiological Plant Pathology* 25 39– 53.

Lamacchia, C., Shewry, P.R., Di Fonzo, N., Forsyth, J.L., Harris, N., Lazzeri, P.A., Napier, J.A., Halford, N.G., Barcelo, P., (2001). Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *Journal of Experimental Botany* 52, 243–250.

Lang C., Dornenburg H., (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases, *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:366– 375.

Large, E.C., 1954. Growth stage in cereals, illustration of the Feeks scale. *Plant Pathology* 32:128-129.

Leckband G., Lorz H., (1998). Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance, *Theor. Appl. Genet.* 97:1004-1012.

Leckie F., Mattei B., Capodicasa C., Hemmings A., Nuss L., Aracri B., De Lorenzo G. and Cervone F. (1999). The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed β -strand/ β -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *The EMBO Journal* 18: 2352-2363.

Léon, J., Lawton, M.A., and Rasking, I (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb C., (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.

Liljeroth, E., Franzon-Almgren, I. and Gunnarsson, T., (1993). Effect of pre-helminthosporol, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana*, on barley roots. *Can. J. Bot.* 72: 558–563.

Liu, W., Zheng, M.Y., Konzak, C.F., 2002. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 20: 821–824.

Lonsdale D.M., Lindup S., Moisan L.J., Harvey A.J., (1990). Using firefly luciferase to identify the transition from transient to stable expression in bombarded wheat scutellar tissue, *Physiol. Plant.* 102: 447/453.

Luck J.E., Lawrence G.J., Finnegan E.J., Jones D.A., Ellis J.G., (1998). A lax trasposon identified in two spontaneous mutant alleles of the *L6* rust resistance gene. *Plant Journal* 16: 365-69.

Maddock S.E., Lancaster V.A., Risiott R., Franklin J., (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*), *J. Exp. Bot.* 34 915/926.

Makarevitch I., Svtashev S.K., Somers D.A., (2003). Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology*, 52, 421–432.

Malamy, J and Clessig, D.F. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2: 643-654.

Manfredini, C., Sicilia F., Ferrari S., Pontiggia D., Salvi G., Caprari C., Lorito M., DeLorenzo G., (2005). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (in press)

Marini F.(2003). Regolazione dell'espressione dei geni *pgip* durante lo sviluppo in fagiolo. Tesi di laurea in Scienze Biologiche Università degli studi della Tuscia , Viterbo.

Mamelink, J., Linthorst, H., Schilperoort, R.A and Hoge, J.H. (1990). Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* 14: 119-126.

Markovic O., Janecek S., (2001). Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution, *Protein Engineering* 14: 615– 631.

Martin G.B., Frary A., Wu T., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Earle E.D., Tanksley S.D.(1993). Map-base cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-1436.

Masci S., D'Ovidio R., Scossa F., Patacchini C., Lafiandra D., O.D. Anderson, A.E. Blechl,(2003). Production and characterization of a transgenic bread wheat line over-expressing a low-molecular-weight glutenin subunit gene, *Molecular Breeding*: 12, Issue 3, :209 - 222

Mason, G., Provero, P., Vaira, AM. And Accotto G. P. (2002). Estimating the number of integration in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology* 2: 20

Mauch-Mani, B. and Slusarenko, AJ. ,(1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the Resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*: 8 (2): 203-212.

McCormac A.C., Wu H.X., Bao M.Z., Wang Y.B., Xu R.J., Elliott M.C., Chen D.F., (1998). The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T.DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.), *Euphytica* 99:17/25.

Milner Y., Avigad G., (1967). A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydrate. Research* 4: 359-361.

Murphy, T.M. and Auh, C.K. (1996). The superoxide synthases of Plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol* 110 (2):621-629.

Nehoff V, Arold N, Taube D and Ehrhardt W., (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels with clear back ground at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G 250 and R 250. *Electrophoresis* 9: 255-62.

- Nehra N.S., Chibbar R.N, Leung N, Caswell K., Millard C., Steinhauer L, Baga M., Kartha K.K., (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scuteller tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs, *Plant J.* 5 :285-297.
- Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M. and Yanofsky, M.F.(1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 387-413.
- Nicholson R; L., Hammerschmidt R., (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Nurnberger, T. et al. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266
- Oeser B, Heidrich PM, Muller U, Tudzynski P, Tenberge KB., (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in *Claviceps purpurea*/rye interaction.*Fungal Genet Biol* 36: 176-86
- Okubara P., Blechl A.E, McCormick S. P.,Alexander N., Dill-Macky R., Hohn T., (2002). Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:74-83
- Oldach K.H., Becker D., Lorz H., (2001). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat, *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 832-838.
- Ozgen, M., Turet, M., Altinok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports* 18, 331–335.
- Ozias P.-Akins, Vasil I.K., (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.(wheat): evidence for somatic embryogenesis, *Protoplasma* 110: 95/105.
- Ozias P.-Akins, Vasil I.K., (1983). Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat), *Protoplasma* 117: 40/44.
- Pang S., DeBoer D.L., Wan Y., Ye G., Layton, J.G. Neher M.K.,. Armstrong C.L, Fry J.E., Hinchee M.A. W, Fromm M.E., (1996). An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants, *Plant Physiol.* 112: 893-900.

Parker JE, Schulte W, Hahlbrock K, Scheel D (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol Plant-Microbe Interact* 4: 19-27

Pastori, G.M., Wilkinson, M.D., Steele, S.H., Sparks, C.A., Jones, H.D., Parry, M.A.J. (2001). Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany* 52, 857–863.

Pattnaik D., Khurana P., (2001). Wheat biotechnology: a minireview, *Elec. J. Biotechnol.* 4 (2) <http://www.ejb.org/content/vol4/issue2/full/4>.

Paxton J.D., 1981. Phytoalexins a working redefinition. *Phytophologische Zeitschrift*, 101: 106-109.

Peng, M.;Kuc, J (1992). Peroxidase-generated hydrogen-peroxide as a source of antifungal activity in-vitro and on tobacco leaf-disks *Phytopathology* 82: (6) 696-699 JUN

Pickersgill R, Smith D, Worboys K, Jenkins J. (1998). Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24660-24664.

Pontiggia D. 2005. Caratterizzazione di inibitori proteici di poligalatturonasi (PGIP) in *Triticum aestivum* L. Tesi di laurea in biotecnologie vegetali 1° livello. Università degli studi della Tuscia di Viterbo.

Powell AL, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB and Labavitch JM., (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant-Microbe Int.* 13:942-950.

Pressey, R. (1996). Polygalacturonase inhibitors in bean pods. *Phytochem* 42: 1267-1270.

Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:593–601

Proctor R.H., Desjardins A.E., McCormick S.P., Plattner R.D., Alexander N.J., Brown D.W. (2002). Genetic Analysis of the Role of Trichothecene and Fumonisin Mycotoxins in the Virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 691 – 698

- Punja Z. K. (2001). Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects. *Can. J. Plant Pathology* 23:216-235.
- Ramanatham V., Simpson C.G., Thow G., Lanetta P.P.M., McNicol R.J. and Williamson B. (1997). cDNA cloning and expression of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus ideaus*). *Journal of Experimental Botany* 48: 1185-1193.
- Rasco-Gaunt, S., Barcelo, P., (1999). Immature inflorescence culture of cereals: a highly responsive system for regeneration and transformation, in: Hall, R. (Ed.), *Methods in Molecular Biology—plant cell culture protocols*. Humana Press Inc., Totowa NJ, pp. 71–81.
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri P.A., (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment, *J. Exp. Bot.* 52: 865/874.
- Repellin A., Baga M., Jauhar P.P., Chibbar R.N. (2001). Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 64: 159/183.
- Richter T.E. and Ronald P.C., (2000). The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* 42: 195-204.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D., (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry* 57 :929– 967.
- Roberti S (2003). Caratterizzazione strutturale e funzionale del locus *pgip* in 'Phaseolus vulgaris'. Tesi di dottorato in Genetica Agraria. Università degli studi della Tuscia- Viterbo.
- Rodriguez-Palenzuela P, Burr J, Collmer A (1991). Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.* 173: 6547-52
- Rooke, L., F. Barro, A.S. Tatham, R. Fido, S. Steele, F. Békés, P. Gras, A. Martin, P.A. Lazzeri, P.R. Shewry & P. Barcelo, (1999a). Altered functional properties of *Triticum aestivum* by transformation with HMW glutenin subunit genes. *Theor Appl Genet* 99: 851–858.
- Rooke L., Bakes F., Fido, R. Barro F., Gras P., Tatham A.S., Barcelo P., Lazzeri P.A., Shewry P.R., (1999). Overexpression of gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength, *J. Cereal Sci.* 30:115/120

Rooke, L., Byrne, D., Salgueiro, S., (2000). Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Annals of Applied Biology* 136, 167–172.

Rooke L., Steele S.H., Barcelo P., Shewry P.R., Lazzeri P.A. (2003). Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica*, 129, 301–309.

Ryals, J., Lawton, K. A., Delaney, T. P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Ukness, S., Vernooij, B., Weymann, K. (1995). Signal trasduction in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4202-4205.

Salvi G., Giarrizzo F., De Lorenzo G. and Cervone F. (1990). A Polygalacturnase-Inhibiting Protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris*.L. *J. Plant Physiol.* 136:513-518.

Sanford J.C. (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:229-302.

Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A. (1990). The P-loop: a common motif in ATP and GTP- binding proteins. *Trends Biochem.* 15: 430-434.

Scheel D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr.Opin. Plant Biol.*1:305-310.

Schonbeck F. and Grunewaldt-Stocker G., (1986). Preformed antimicrobial compounds in relation to disease resistance. In *Natural Antimicrobial Systems*, Gould J. W., Rhodes Roberts M. E., Charneley A. K., Cooper R. M. and Board R.G. (Eds.), pp. 176-190. Bath University Press.

Scossa F. (2006). Comparative transcriptional and proteomics profiling of bread wheat cultivar Bobwhite and its derived transgenic line overexpressing a LMW-GS gene. Tesi di dottorato in Biotecnologie vegetali XVIII ciclo Università degli studi della Tuscia di Viterbo.

Sears R.G., Deckard E.L., (1982). Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration, *Crop Sci.* 22: 546/550.

Serazetdinova L., Oldach K.H, Lorz H., (2005). Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*:162:985-1002.

Shewry P.R. and Jones H.D. (2005) Transgenic wheat: where do we stand after 12 years?. *Annals of Applied Biology* 147:1-14.

Shimada T(1978). Plant regeneration from the callus induced from wheat embryos, *Jpn. J. Genet.* 53 371/375.

Shimada T., Yamada Y., (1979). Wheat plants regenerated from embryo cell cultures, *Jpn. J. Genet.* 54 379/386.

Simmons, S.R., E.A. Oelke, and P.M. Anderson. (1995). Growth and development guide for spring wheat. FO-2547-D. Minnesota Ext. Serv., St. Paul

Sivamani, C.W. Brey, W.E. Dyer, L.E. Talbert, R. Qu, (2000). Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat expressing the viral replicase (NIb) gene, *Mol. Breed.* 6 :469/477.

Sivamani E., Brey C.W., Talbert L.E., Young M.A., Dyer W.E, Kaniewski W.K., Qu R., (2002). Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene, *Transgenic Res.* 11 31/41.

Smith C.J., (1996). Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.*, 132: 1-45.

Sparks, C.A., Jones, H.D., (2004). Transformation of wheat by biolistics, in: Curtis, I. (Ed.), *Transgenic Crops of the World—Essential Protocols*. Kluwer, Dordrecht.

Stahl, E.A. and Bishop, J.C. (2000). Plant–pathogen arms races at the molecular level. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 299–304

Stoger, E., S. Williams, D. Keen & P. Christou, (1998). Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Trans Res:* 7 463–471.

Srivastava, V., V. Vasil & I.K. Vasil, (1996). Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat. *Theor Appl Genet* 92: 1031–1037.

Szecei A. (1990). I. Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* species. II. Comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. J. Phytopathol. 130: 188-196

Tai TH, Tanksley, SD, (1990). A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. Plant Mol Biol Rep; 8:297-303.

Taiz L., Zeiger E. (1996) Fisiologia vegetale. Ed Piccin Nuova Libreria S.p.A Padova.

Taylor R.J. and Secor G.A. (1998). An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of *Erwinia* culture filtrates. Phytopathology 78: 1101-1103.

Ten Have A, Mulder W, Visser J, Van Kan JA (1998).The endo polygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. Mol Plant Microbe interact. 11:1009-16.

Terry M.E., and Bonner B.A.,(1980) An examination of centrifugation as a method of extracting an extracellular solution from peas, and its use for the study of indolacetic acid-induced growth. Plant Physiol. 66: 321-325.

Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Crameri R., Davies J.E., Lauwereys M., Botterman J., (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus* , EMBO J. 6 2519-2523.

Tosi, P., D'Ovidio, R., Napier, J.A., Bekes, F., Shewry, P.R., (2004). Expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in the starchy endosperm of transgenic wheat and their incorporation into glutenin polymers. Theor. Appl. Genet. 108: 468-476.

Traut T.W., (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. Eur. J. Biochem. 229: 9-19.

Urban U., Daniels S., Mott E., Hammond-Kosack K., (2002). Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. Plant Journal 32:961-973.

van der Hoorn, R.A. et al., (2005) Structure–function analysis of cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmic leucine-rich repeats. Plant Cell 17, 1000–1015

van Loon L.C., Van Kammen A., (1970). Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40: 199-211.

Van Santen Y, Benen JA, Schroter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, Dijkstra BW, (1999). 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 274: 30474–30480

Vasil V., Srivastava V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K., (1993). Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos, *Bio/technology* 11: 1553/1558.

Vasil V., Srivastava V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K., (1993). Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos, *Bio/technology* 11:1553/1558.

Vaucheret, H., Bècli, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, JB., Mourrain, P., Palauqui, JC., Vernhetters, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-659.

Vernooij, B. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant cell* 6: 959-965.

Vivian, A. and Arnold, D.L. (2000). Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *Journal Plant Pathol.* 82 (3): 163-178.

Wang G.L., Song W.Y., Ruan D.L., Sideris S. and Ronald P.C. (1996). The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9: 850-55.

Wang G.L., Ruan D.L., Song W.Y., Sideris S., Chen L.L., Pi L.Y., Zhang S.P., Zhang Z., Fauquet C., Gaut B.S., Whalen M.C. and Ronald P.C. (1998). Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* 10: 765-779.

Wang, C.T., Wei, Z.M., 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77, 149–156.

Wanjiru WM, Kang ZS, Buchenauer H (2002). Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. European J. Plant Pathol. 108: 803-810.

Weir B., Gu X., Wang M., Upadhyaya N., Elliott A.R., Brettell R.I.S., (2001) *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker, Aust. J. Plant Physiol. 28 807/818.

Weeks JT, Anderson OD, Blechl AE (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). Plant Physiol. 102: 1077-1084.

Widholm, J.M (1996). "In vitro selection and culture induced –induced variation in soybean" Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology (eds. D.P.S. Verma and R. Shoemaker) pp. 107-126

Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H.D. (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. Plant Cell Reports, 21, 659–668.

Zhang L., French R., Langenberg W.G., Mitra A., (2001) Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease, Transgenic Res. 10:13/19.

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va al Prof. Renato D'Ovidio che mi ha insegnato tutto ciò che mi è servito per svolgere questa tesi di dottorato, confortandomi e sopportandomi durante questi tre anni.

Ringrazio la Prof.ssa Stefania Masci e il Prof. Domenico Lafiandra, Coordinatore del Corso di Dottorato di Ricerca, per il sostegno e per avermi ospitato nel loro laboratorio.

Ringrazio ancora il Prof. Felice Cervone e la Prof.ssa Giulia De Lorenzo ed i loro collaboratori del laboratorio di Fisiologia Vegetale dell'Università di Roma La Sapienza, ed il Prof. Francesco Favaron ed i suoi collaboratori del laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università di Padova per la condivisione delle metodologie sperimentali, per le PG ed i ceppi patogeni forniti.

Vorrei inoltre ringraziare la Fondazione Armenise Harvard per aver cofinanziato il mio dottorato di ricerca.

Un doveroso ringraziamento va poi a tutti gli amici del Lab di Fisiologia Vegetale e di Genetica e Biochimica delle proteine vegetali e di Citogenetica vegetale dell'Università di Viterbo miei compagni di avventura e di sventura senza i quali sarebbe stato difficile arrivare alla fine del dottorato.

Un ringraziamento dal profondo del cuore va ad Andrea Gennaro mio compagno d'avventura nel dottorato e nella vita per avermi aiutato e sostenuto durante questi anni.

Ringrazio infine la Direzione del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica di questa Università per aver messo a disposizione strutture e attrezzature di cui ho potuto usufruire, il collegio docenti per l'attività svolta nell'ambito del corso di dottorato e il Sig. Capuani per la pazienza e l'efficienza dimostrata negli adempimenti burocratici.

Ultimi ma non ultimi ringrazio i miei genitori per avere ancora una volta creduto in me sostenendomi durante questo percorso.