

UNIVERSITA' DI PISA
Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
Dipartimento di Produzioni Vegetali

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
"ORTOFLOROFRUTTICOLTURA"
XIX CICLO

*"INTERAZIONI ORMONALI NELLO SVILUPPO DEL FRUTTO
E DEL SEME DI POMODORO"*
"BIO 04"

Coordinatore:
Chiar. mo Prof. Francesco Saccardo

Tutor:
Chiar. mo Prof. Nello Ceccarelli

Chiar. mo Prof. Piero Picciarelli

Dottorando:
Lorenzo Mariotti

Anni di corso, 2004-2006

A Federica e ai miei genitori

Se vuoi il riposo dell'anima e la felicità, credi.
Se vuoi essere discepolo della verità, allora ricerca!
F.Mauriac, I cinque volti dell'angoscia, pag. 97

...foste non fatti
a viver come bruti,
ma per seguir virtute e conoscenza.
D. Alighieri, Inferno canto XXVI

Il lavoro del ricercatore è simile a quello di un archeologo
che cerca frammenti di verità in puzzle sconfinato
I. Marino L'espresso n° 27, 2005

INDICE

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	pag. 6
1. INTRODUZIONE	pag.8
1.1. <u>Importanza economica del pomodoro</u>	pag.9
1.2. <u>Botanica del pomodoro</u>	pag.9
1.2.1. Caratteristiche morfologiche della pianta	pag.9
1.2.2. Biologia fiorale	pag.10
1.2.3. Biologia del frutto	pag.11
1.3. <u>La partenocarpia</u>	pag.14
1.3.1. La partenocarpia naturale	pag.14
1.3.2. La partenocarpia indotta artificialmente	pag.16
1.4. <u>Ormoni e sviluppo del frutto</u>	pag.17
1.4.1. Gibberelline	pag.18
1.4.2. Biosintesi delle gibberelline	pag.20
1.4.3. Auxine	pag.22
1.4.4. Citochinine	pag.23
1.4.5. Etilene	pag.24
1.5. <u>Scopo del lavoro</u>	pag.25
2. MATERIALI E METODI	pag.26
<u>2.1. Materiale vegetale: condizioni di crescita e schema sperimentale</u>	pag.27

<u>2.2. Raccolta del materiale per le analisi ormonali</u>	pag.28
<u>2.3. Analisi dei fitormoni endogeni</u>	pag.29
2.3.1. Protocollo sperimentale per l'analisi delle gibberelline e dell'acido indolacetico	pag.29
2.3.2. Protocollo sperimentale per l'analisi delle citochinine	pag.34
2.3.3. Protocollo sperimentale per l'analisi dell'etilene	pag.36
<u>2.4. Espressione dei geni del metabolismo delle gibberelline</u>	pag.36
<u>2.5. Analisi di alcuni parametri qualitativi</u>	pag.40
 3. RISULTATI	pag.43
<u>3.1. Analisi ormonale</u>	pag.44
3.1.1. Livelli endogeni delle GAs	pag.44
3.1.2. Livelli endogeni di IAA	pag.49
3.1.3. Livelli endogeni di citochinine	pag.52
3.1.4. Produzione di etilene	pag.54
<u>3.2. Espressione dei geni del metabolismo delle GAs</u>	pag.55
<u>3.3. Parametri qualitativi dei frutti</u>	pag.57
 4. DISCUSSIONE	pag.62
 RINGRAZIAMENTI	pag.73
 5. BIBLIOGRAFIA	pag.74

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

- ASC: acido ascorbico
- bp: paia di basi
- BHT: butil-idrossitoluene
- BSTFA: bis trimetil-silil trifluoroacetamide
- CH₃COOH: acido acetico
- CK: citochinine
- 4-CPA: acido 4-clorofenossiacetico
- CPPU: cloro-piridil-difenilurea
- Da: dalton
- DAP: giorni dall'impollinazione
- DAT: giorni dal trattamento auxinico
- DBA: un giorno prima dell'antesi
- DEAE-Cellulose: dietilamminoetil-cellulosa
- DHZ: diidrozeatina
- DHZR: diidrozeatina riboside
- DNA: acido deossiribonucleico
- DNA-asi: enzima deossinucleasi
- DTT: ditiotreitolo
- EDTA: acido etilendiamminotetracetico
- GAs: gibberelline
- GA20ox: GA20ossidasi
- GA3ox: GA3ossidasi
- GC/MS: gas cromatografo/spettrometro di massa
- HCl: acido cloridrico
- HPLC: cromatografia liquida ad alta pressione
- IAA: acido indolacetico
- ID: diametro interno
- iP: isopenteniladenina
- iPR: isopenteniladenosina
- M⁺: ione molecolare

- MeOH: metanolo
- m/z: massa/carica
- NTP: nucleoside trifosfato
- PCR: reazione a catena della DNA polimerasi
- Real Time PCR: reazione a catena della DNA polimerasi in tempo reale
- RNA: acido ribonucleico
- *Sl*: *Solanum lycopersicum*
- TMCS: trimetilclorosilano
- *wt*: *wild-type* (genotipo selvatico)
- Z: zeatina
- ZR: zeatina riboside

1. INTRODUZIONE

1.1 Importanza economica del pomodoro

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L., $2n=24$) è una delle più importanti specie orticole coltivate in tutto il mondo. Il frutto, consumato sia allo stato fresco sia sotto la forma di diversi derivati dell'industria conserviera, è un importante fonte di minerali, vitamine e acidi organici. In Italia, all'inizio del 1900, la sua coltivazione aveva già un rilevante peso economico e la superficie coltivata si è estesa molto rapidamente fino a raggiungere nel 2004 circa 88.000 ha, con una produzione media complessiva di 5.5 milioni di tonnellate annue. Circa il 60% della superficie coltivata a pomodoro è situato nell'Italia meridionale, in particolare in Campania, il restante 40% della superficie si divide tra Italia settentrionale e centrale, soprattutto in Emilia Romagna.

Il centro di origine del pomodoro è collocato nell'America Latina, precisamente nell'area che si estende dal nord del Cile all'Ecuador fino al sud della Colombia e alla costa pacifica comprese le isole Galapagos, mentre nell'entroterra si estende fino alla catena montuosa delle Ande così da raggiungere un'altitudine attorno ai 3400 m. Da quest'area si origina la specie di pomodoro coltivata, che si è largamente diffusa anche nelle aree tropicali e subtropicali dell'America fino al Texas e alla Florida.

Per la sua notevole adattabilità ambientale, il pomodoro è un esempio di gran successo del miglioramento genetico che ha consentito straordinari incrementi produttivi e il miglioramento di caratteristiche qualitative ma anche per l'adattamento della specie alle tecniche colturali. In Italia la coltura del pomodoro da industria continua ad avere il primato di coltivazione tra le colture ortive anche se negli ultimi anni le superficie coltivate sono diminuite.

1.2. Botanica del pomodoro

1.2.1. Caratteristiche morfologiche della pianta

La morfologia della pianta, originariamente a portamento espanso, strisciante e molto allungato, ha subito profonde manipolazione genetiche in rapporto alle nuove tecniche colturali e all'economia generale della coltura, passando dall'originaria forma espansa della pianta a forme più raccolte e infine a quelle a fusto eretto.

Il fusto è eretto nei primi stadi di sviluppo, poi diventa decumbente e bisognoso di un tutore. E' costituito da nodi ingrossati, dai quali si dipartono le foglie e i getti ascellari, e da internodi più o meno lunghi dai quali si sviluppano le infiorescenze. L'accrescimento può essere indefinito o determinato: in quest'ultimo caso l'apice vegetativo dello stelo e dei germogli, dopo aver dato luogo ad un certo numero di foglie e di infiorescenze, termina la crescita producendo un'infiorescenza.

La disposizione delle foglie sugli steli è alterna. Le foglie sono imparipennate, picciolate, lunghe 20-30 cm e sono composte da 7-11 foglioline diseguali; spesso i lobi presentano bollosità più o meno pronunciate. Tutte le parti verdi della pianta sono ricoperte da peli ghiandolari che secernono, al contatto, una sostanza di odore acre: la solanina.

1.2.2. Biologia florale

La pianta del pomodoro appartiene all'ordine delle angiosperme. La caratteristica che contraddistingue le angiosperme è il fiore, un germoglio ad accrescimento determinato costituito da organi detti "sporofilli" tra i quali i carpelli che costituiscono la parte fertile del fiore che ripiegandosi nel senso della lunghezza formano nel loro insieme il gineceo.

La fioritura è scalare, con progressiva formazione delle infiorescenze in tempi diversi e internodi successivi lungo il fusto principale e quelli secondari. I fiori sono ermafroditi con peduncoli articolati e non, riuniti in infiorescenze a racemo portate lungo il fusto o sulle ramificazioni più grosse. Le infiorescenze possono essere costituite da racemi semplici, biforcuti o ramificati. Il tipo semplice si trova più frequentemente nella parte basale della pianta, mentre i tipi ramificati si solito si trovano nella parte superiore. Il numero di fiori per infiorescenza varia e nello stesso racemo la fioritura spesso non è contemporanea. Si possono anche avere nella stessa infiorescenza piccoli frutti, fiori aperti e fiori ancora chiusi.

Il singolo fiore è dotato di un calice gamosepalo, costituito generalmente da cinque sepali verdi e persistenti. La corolla è rotata, con un numero di petali normalmente pari a cinque di colore giallo. Gli stami, solitamente dello stesso numero degli elementi che formano la corolla, sono corti e uniti tra loro a livello delle antere biloculari a formare una sorta di cono attorno al pistillo. L'ovario è supero e

bicarpellare, ma si presenta plurisetato, e porta molti ovuli a placentazione parietale. Lo stilo ha lunghezza variabile e si presenta slargato nella parte terminale a formare lo stigma, il quale, nei tipi lungi-stilo, può sporgere dal cono delle antere favorendo l'impollinazione incrociata.

All'apertura della corolla inizia il periodo di recettività degli stigmi, mentre la deiscenza degli stami ha inizio solo 24-48 ore dopo, prima nei fiori più vicini all'inserzione dell'infiorescenza sullo stelo e poi gradualmente negli altri. Le antere del cono staminale che circonda il pistillo deiscono verso l'interno, assicurando in tal modo l'impollinazione. A causa dell'anticipo di maturità dello stigma, rispetto alla deiscenza delle antere, può avvenire, anche se raramente, che polline estraneo provochi la fecondazione, cosa che accade più frequentemente in alcune varietà a stilo lungo o nei casi di proteroginia. Il pomodoro coltivato è altamente autogamo, infatti, la frequenza della fecondazione incrociata è mediamente indicata nei valori dello 0.5-4%.

La germinazione del polline è alquanto lenta e la fecondazione avviene mediamente due giorni dopo l'impollinazione. Le condizioni ambientali in questo lasso di tempo possono compromettere il processo. La temperatura ottimale per la fioritura è 23°C e le cultivar moderne allegano bene entro un intervallo di temperatura limitato che si aggira tra i 15-21°C di notte e 25-31°C di giorno. Al di fuori di questi intervalli, l'allegazione è difficoltosa perché non è prodotta una quantità sufficiente di polline fertile, si ha difficoltà nella deiscenza delle antere quindi nell'impollinazione e di conseguenza nella fecondazione (Lukyanenko, 1991).

1.2.3. Biologia del frutto

Il frutto di pomodoro è una bacca di grandezza e forma molto variabile, di colore rosso di diversa tonalità sino al giallo-bianco di alcune vecchie cultivar. Il contorno della bacca può essere liscio o variamente costoluto con la presenza di depressioni longitudinali che suddividono la superficie del frutto in spicchi a partire dall'estremità peduncolare. Il frutto è costituito da epicarpo, mesocarpo e endocarpo. L'epicarpo, o epidermide, risulta formato da cellule poligonali molto appiattite che danno origine ad una pellicola più o meno resistente che tende ad assottigliarsi verso la maturazione.

Il mesocarpo, o polpa, è formato da diversi strati cellulari (20-30) con all'interno fasci vascolari.

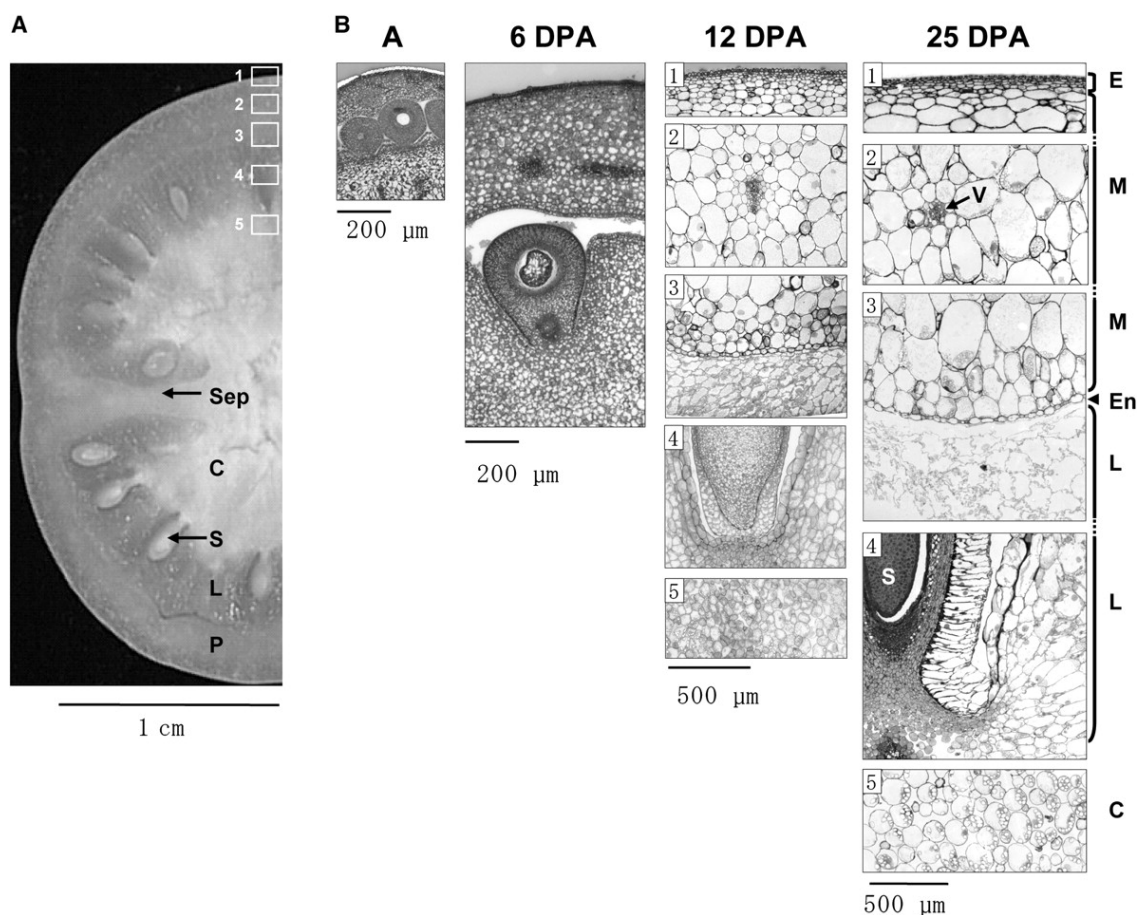


Fig. 1: Struttura del pomodoro durante le prime fasi di sviluppo. A) sezione di un frutto 22 dopo l'antesi. B) Sezione di tessuto di un ovario all'antesi (a) e sezione della regione equatoriale del frutto 6- 12- 25 giorni dopo l'antesi (6 DPA, 12 DPA e 25 DPA rispettivamente). I numeri da 1-5 indicano le regioni del frutto prelevate 12 e 25 giorni dopo l'antesi. P) pericarpo, Sep) setto; E) esocarpo; M) mesocarpo; En) endocarpo; L) tessuto loculare; S) semi; C) columella; V) fascio vascolare (M. Lemaire-Chamley et al., 2005).

Le cellule del mesocarpo sono di grosse dimensioni nella regione centrale (~250 μm) e diminuiscono man mano che si procede verso l'epidermide e la cavità loculare.

L'endocarpo, formato da un singolo strato di cellule, riveste le cavità loculari. Questi ultimi, suddivise da setti, sono interamente occupate dal tessuto loculare con i semi che si originano dalla placenta. La parte centrale del frutto denominata columella

può apparire meno colorata del pericarpo a causa dell'inclusione di ampi spazi di aria che rendono il tessuto più chiaro (Fig.: 1).

Il tempo che intercorre tra l'allegagione e la maturazione del frutto varia in dipendenza del tipo di ciclo, delle condizioni colturali e climatiche, più che della varietà. In media per raggiungere il massimo accrescimento il frutto impiega 40-70 giorni. La colorazione del frutto maturo è dovuta alla presenza di diversi pigmenti. Durante la maturazione prevalgono le clorofille a e b, successivamente queste sono demolite e cominciano ad accumularsi due carotenoidi: il licopene di colore rosso e il β -carotene di colore giallo-arancio.

Lo sviluppo del frutto può essere più correttamente definito come la differenziazione di organi preesistenti e può essere suddiviso schematicamente in quattro fasi:

- Fase I: comprende lo sviluppo dell'ovario all'interno del bocciolo florale fino all'antesi (distensione della corolla e deiscenza delle antere), include il destino dell'ovario: verso la senescenza (aborto), o verso la formazione del frutto (allegagione).
- Fase II: comprende la divisione cellulare che dura per 7-14 giorni dopo l'impollinazione (Mapelli et al., 1978). In questa fase il frutto raggiunge circa il 10 % del peso fresco finale.
- Fase III: principalmente include l'espansione cellulare che, in relazione al genotipo, prosegue per 3-5 settimane ed è responsabile del raggiungimento della massima dimensione del frutto (Ho e Hewitt, 1986). La dimensione finale del frutto dipende dal numero di cellule differenziate nella seconda fase (Ho, 1996), dal numero di cellule dentro l'ovario prima della fecondazione e dal numero degli ovuli fecondati nell'ovario.
- Fase IV: comprende la maturazione, che è caratterizzata da una lenta crescita e intensi cambiamenti metabolici.

Vi sono altri fattori che influenzano lo sviluppo del frutto: il tipo di cultivar, le condizioni climatiche, le pratiche colturali e la posizione del frutto sul palco florale.

1.3. La partenocarpia

Il termine partenocarpia è stato introdotto da Noll nel 1902 per indicare il fenomeno della formazione di frutti senza semi in assenza di impollinazione. Soltanto nel 1942 Gustafson, autore di importanti contributi sull'argomento, descrisse esempi di partenocarpia in molte specie vegetali di interesse agrario tra cui il pomodoro. Gustafson riprese il termine partenocarpia, seguito da altri autori (Lukyanenko, 1991), per indicare lo sviluppo di un frutto senza impollinazione e/o fertilizzazione, facendo però una distinzione tra partenocarpia naturale e artificiale.

La partenocarpia è stata studiata per lungo tempo come un modo interessante per limitare le conseguenze della bassa allegagione durante condizioni ambientali sfavorevoli.

1.3.1. La partenocarpia naturale

La partenocarpia naturale è data da una predisposizione genetica e può essere distinta in (Tab. 1):

- obbligatoria cioè totalmente di origine genetica;
- facoltativa dovuta a fattori genetici ma influenzata dalle condizioni ambientali;
- accidentale dovuta essenzialmente alle condizioni ambientali;

Nella partenocarpia naturale facoltativa, i fattori genetici agiscono con prevalenza su quelli ambientali portando alla formazione di bacche prive di semi.

Condizioni ambientali sfavorevoli, quali bassa o alta temperatura, irradianza, fotoperiodo, umidità relativa, concimazioni, agiscono sui tessuti del gametofito o dello sporofito inducendo la formazione di frutti partenocarpici (George et al., 1984).

Gli studi sulla partenocarpia naturale in pomodoro hanno evidenziato la presenza di geni ad eredità semplice capaci di indurre la formazione di bacche partenocarpiche (Tab. 2) (Salamini e Sorressi, 1975; Philouze e Maisonneuve, 1978; Philouze, 1983).

Nelle cultivars oline Montfavet 191, Severianin e RP 75/56 la formazione delle bacche è sotto il controllo di un singolo gene recessivo, rispettivamente il gene *pat* (parthenocarpic fruit) (Sorressi e Salamini 1975), il gene *pat-2* (Philouze e Maisonneuve, 1978) e il gene *pat-3/4* (Nuez et al., 1986); i tre geni non sono allelici tra loro.

Il gene *pat*, ottenuto per mutazione chimica, produce frutti che sono due terzi più piccoli di quelli normali e con pochissimi semi anche in condizioni ambientali favorevoli.

Il fenotipo descritto è il risultato di una mutazione recessiva di un singolo gene con effetto pleiotropico. Studi citologici hanno mostrato che la crescita dell'ovario nei mutanti *pat* inizia allo stadio di pre-antesi mentre nel genotipo selvatico inizia due giorni dopo l'antesi (Mazzucato et al., 1998). Anche se il mutante *pat* costituisce un ottimo materiale sperimentale per studi genetico-molecolari della partenocarpia la sua coltivazione è limitata dalle ridotte dimensioni delle bacche e dalla difficoltà nella produzione del seme (Philouze e Pecaut, 1986).

Il gene *pat-2*, a differenza di *pat*, è più sensibile alle condizioni ambientali: infatti in condizioni ambientali sfavorevoli il mutante *pat-2* produce bacche con un aspetto simile a quelle del *wt* ma senza semi mentre in condizioni ambientali ottimali produce frutti di dimensioni normali e con seme (partenocarpia facoltativa). Il gene *pat-2* mostra effetti pleiotropici negativi che possono essere superati scegliendo un adeguato background genetico. Recenti informazioni mostrano che la partenocarpia indotta dal gene *pat-2* è dipendente dalle GAs infatti questo mutante ha alti livelli di GA₂₀, GA₁ e GA₈ (Fos et al., 2000).

Partenocarpia Naturale	Obbligata	Soltanto fattori genetici
	Facoltativa	Fattori genetici predominanti
	Accidentale	Fattori ambientali predominanti
Partenocarpia Artificiale	Indotta con trattamenti chimici (Auxine–Gibberelline)	

Tab 1 Possibilità per ottenere frutti partenocarpici

La linea RP 75/59, derivata dell'incrocio tra “Atom x Bubjekosoko”, denominata *pat-3/4*, presenta un livello alto di partenocarpia senza effetti apprezzabili sulle dimensioni dei frutti (Philouze, 1989).

Nella linea RP 75/59, per ottenere frutti senza semi, le piante devono crescere in condizioni ambientali sfavorevoli all'impollinazione e/o alla fecondazione;

alternativamente i fiori devono essere emasculati. La disomogeneità dei frutti normali e partenocarpici nello stesso palco florale rendono questo mutante poco utilizzato negli incroci. Anche nel pat-3/4 sono stati riscontrati alti livelli di GA biologicamente attive negli ovai prima dell'antesi (Fos et al., 2001).

Si ha invece partenocarpia accidentale quando la formazione di frutti apireni è del tutto occasionale e il loro aspetto è diverso da quello dei frutti normali (Philouze, 1983). La partenocarpia accidentale è poco frequente: in questo caso i fattori ambientali e colturali predominano sui fattori genetici impedendo l'impollinazione e la fecondazione, favorendo l'accumulo di auxine e gibberelline negli ovai e permettendo così lo sviluppo autonomo dell'ovario.

1.3.2. La partenocarpia indotta artificialmente

La partenocarpia artificiale può essere indotta con:

- stimolazioni meccaniche;
- manipolazione del polline (estratto, devitalizzato ecc);
- regolatori di crescita (auxine e gibberelline).

Il principale mezzo di induzione è rappresentato dai regolatori di crescita, in particolare sostanze auxiniche e gibberelline. Gustafson nel 1936 ottenne per primo frutti di pomodoro partenocarpici di adeguate dimensioni utilizzando unicamente sostanze chimiche (IAA, IBA e penicilline). Successivamente Nitsch (1972), dimostrò che numerose sostanze di crescita naturali e sintetiche inducono lo sviluppo di frutti senza semi in varie specie, ma nella maggior parte dei casi i frutti ottenuti risultano di dimensioni, forma e struttura interna diversi da quelli naturali.

Il trattamento con auxine, dopo emasculazione dei fiori, promuove la crescita e lo sviluppo del frutto (Koshioka et al., 1994). L'applicazione di GA₃ agli ovai di piante emasculate induce lo sviluppo del frutto che raggiunge tuttavia dimensioni e peso finale spesso minori rispetto a quelli dei frutti ottenuti a seguito di impollinazione o trattamento auxinico. Tuttavia, sono state riscontrate differenze significative tra le cultivar prese in esame (Fos et al., 2000). Dal punto di vista commerciale i prodotti più utilizzati come alleganti contengono auxine (Lipari, 1979) e le gibberelline (GA₃). A titolo di esempio, nel pomodoro da industria è utilizzato il fitoregolatore allegante Fruttur AG, specificamente registrato per questo uso, composto da una miscela di

auxine (acido β -naftossiacetico-BNOA, al 2.5%), ammidine dell'acido α -naftalenacetico (NAD all'1.5%) e gibberelline (GA₃ allo 0.2%). Spesso l'uso indiscriminato di queste sostanze ha portato diversi autori a raccomandare di porre attenzione alla concentrazione e al numero di trattamenti (Giaquinto e Pampini, 1988) per evitare malformazioni dei frutti.

1.4. Ormoni e sviluppo del frutto

L'allegagione e lo sviluppo del frutto costituiscono processi complessi molto coordinati, regolati spazialmente e temporalmente, che coinvolgono l'azione reciproca di un numero di fattori biotici e abiotici.

Le cinque classi ormonali, vale a dire, auxine, citochinine, gibberelline, etilene e acido abscissico (ABA) sono tutte coinvolte nella modulazione della crescita e dello sviluppo del frutto. (Ozga and Rienecke, 2003).

Nonostante la diversità morfologica, i frutti condividono eventi comuni e vie metaboliche cruciali per il loro sviluppo. Lo sviluppo di un frutto può essere separato in fasi che includono la pre-impollinazione, l'impollinazione, la fecondazione e allegagione, la post-allegagione, la maturazione e la senescenza. La fecondazione dell'ovulo è seguita dalla divisione, e espansione cellulare che determinano la crescita del frutto. Nei frutti, i semi e gli ormoni in essi prodotti (Crane, 1969), sono ritenuti essenziali per il normale sviluppo dei frutti; le dimensioni e la forma di molti frutti sono determinate dal loro numero e distribuzione. Gli ormoni delle piante sono considerati fondamentali anche per una corretta successione delle fasi di sviluppo di un frutto.

Nonostante la mole di informazioni accumulate sugli effetti degli ormoni sulla crescita e lo sviluppo delle piante, la conoscenza del loro modo di azione a livello molecolare è per molti processi ancora limitata. Il pomodoro è considerato un sistema modello per studiare il ruolo degli ormoni nello sviluppo del frutto anche in considerazione della disponibilità di numerosi mutanti. Tuttavia, rimangono da chiarire ancora numerosi aspetti dell'azione ormonale, in particolare come sono regolate nel tempo e nello spazio le vie di biosintesi e le interazioni tra i diversi gruppi ormonali. Da sottolineare che in letteratura i pochi dati disponibili sulle interazioni ormonali sono stati ottenuti in pisello.

Per descrivere il ruolo degli ormoni nello sviluppo del frutto di pisello è stato proposto un modello, ancora in parte speculativo, che descrive l'allegagione e sviluppo del pericarpo come il risultato dell'azione sequenziale di auxine e gibberelline. L'impollinazione/fecondazione stimola l'espressione del gene della *GA3ox*, con conseguente aumento della sintesi di GA₁, nei semi e nel pericarpo. Successivamente, il seme promuove la crescita del frutto, tramite l'esporto di auxine (4-Cl-IAA) verso il pericarpo le quali mantengono elevato il livello di GA₁ stimolando l'espressione dei geni *GA20ox* e *GA3ox* (Ozga et al., 2003). Successivamente questo modello è stato integrato ipotizzando il coinvolgimento dell'etilene che, in condizioni fisiologiche sfavorevoli per la crescita del frutto, bloccherebbe l'azione della GA₁ mentre il Cl-IAA inibirebbe l'azione dell'etilene (Johnstone et al., 2005).

1.4.1. Gibberelline

Le gibberelline sono coinvolte in molti aspetti della crescita e dello sviluppo delle piante e insieme alle auxine, svolgono un ruolo determinante nello sviluppo dell'ovario in frutto. La funzione delle gibberelline è prevalente durante la fase di distensione cellulare (Abdel-Rahman, 1977) anche se studi successivi hanno osservato il coinvolgimento di questa classe ormonale anche in altre fasi di sviluppo del frutto.

L'applicazione esogena di GAs all'antesi, sul fiore di pomodoro, induce lo sviluppo di frutti partenocarpici. (Fos et al., 2000). E' stato ipotizzato che durante l'impollinazione le GAs prodotte dal polline possano stimolare un aumento della produzione di auxine nell'ovario, con induzione dell'allegagione e della divisione cellulare nell'ovario (Gillapsy et al., 1993).

Studi effettuati su pericarpo e semi in pomodoro mostrano che i livelli di GA₁ e GA₂₀ sono alti nei primi stadi di sviluppo; durante lo sviluppo il livello di GA₁ decresce nel pericarpo mentre nei semi rimane costante (Bohner et al., 1988). Mapelli et al. (1978) hanno evidenziato una maggiore attività gibberellinica nei frutti partenocarpici, nei primi 8 giorni di sviluppo del frutto, rispetto ai frutti con i semi. Maggiori livelli di GAs sono stati trovati anche in altri mutanti partenocarpici, *pat-2* e *pat-3/4* (Fos et al., 2000; 2001).

L'applicazione di inibitori della biosintesi di GAs, paclobutrazolo e uniconazolo, applicati agli ovari di fiori emasculati di mutanti partenocarpici e a fiori *wt* trattati con

auxine (4-CPA) inibiscono la crescita e lo sviluppo del frutto; la successiva applicazione di GA₃ ristabilisce le normali condizioni di crescita (Fos et al., 2000, Kataoka et al., 2004).

I mutanti per le GAs si possono dividere in due gruppi:

- Mutanti sensibili alle GAs
- Mutanti insensibili alle GAs

I mutanti sensibili alle GAs rispondono, cioè la pianta si accresce, alla somministrazione esogena di GAs biologicamente attive. Questi mutanti presentano un blocco alla via biosintetica delle GAs: ad esempio il mutante di pomodoro *gib-1* è bloccato nella conversione del geranilgeranil pirofosfato in copalil pirofosfato, il mutante *gib-2* è bloccato nella conversione dell'acido ent-7 idrossikaurenoico in GA₁₂-aldeide e il mutante *gib-3* è bloccato nella conversione di copalil pirofosfato in entkaurene (Bensen and Zeevaart, 1990).

I mutanti insensibili alle GAs si dividono in *dwarf* e *slender*. I mutanti *dwarf* sono insensibili sia alle GAs endogene sia alle applicazioni esogene e presentano un fenotipo nano. I mutanti *dwarf* sono caratterizzati da una alterazione della proteina DELLA che funziona da repressore del segnale delle GAs. Nei mutante *dwarf* si è verificata un'alterazione a livello di una proteina componente del complesso del proteosoma SKF-ubiquitina, che blocca il segnale delle GAs e inibisce la degradazione della proteina DELLA. In *Arabidopsis* gli alleli recessivi per *sleepy* (*sly*), *pickle* (*pkl*), *short internodes* (*shi*) e *gai 1-1* inducono la formazione di mutanti con fenotipo *dwarf*.

I mutanti tipo *slender* presentano alterazioni nelle proteine DELLA che quindi non riescono ad esercitare più l'azione di blocco nei confronti delle GAs. Questa alterazione comporta la formazione di piante con fenotipo allungato. Un tipo di accrescimento simile a quello che si ottiene in presenza di sovraespressione dei geni che codificano per la biosintesi delle GAs. I mutanti dei geni GAI, RGA e SPINDLY (SPY) causano il fenotipo di tipo *slender*.

Il ruolo delle gibberelline prodotte dai semi sullo sviluppo del frutto è stato studiato in un mutante di pomodoro con bassi livelli di GAs, il mutante *ga-1*, nel quale la biosintesi è bloccata. Questi lavori hanno dimostrato che le GAs sono indispensabili per lo sviluppo dei fiori fertili, per la germinazione dei semi e stimolano le prime fasi di sviluppo del frutto e dei semi (Groot et al., 1987).

1.4.2. Biosintesi delle gibberelline

Il metabolismo delle gibberelline è stato studiato nel fungo *Gibberella fujikuroi* e in alcune specie di piante superiori è ormoni conosciuto (McMillan, 1997).

La biosintesi delle GA nelle piante superiori può essere divisa in tre stadi (fig. 2):

- 1) biosintesi dell'*ent*-kaurene nei plastidi;
- 2) conversione dell'*ent*-kaurene a GA_{12}/GA_{53} ;
- 3) conversione di GA_{12}/GA_{53} in GAs a 20 (C_{20} -GAs) e 19 (C_{19} -GAs) atomi di carbonio nel citoplasma.

La via biosintetica delle GAs ha inizio con la reazione tra l'isopentenil-difosfato (IPP) e il dimetilallil-difosfato per formare il diterpene trans-geranilgeranil-difosfato (GGPP). Successivamente il GGPP è convertito in *ent*-copalil difosfato (CDP) e poi in *ent*-Kaurene, il precursore di tutte le GAs. Gli enzimi che catalizzano questi due passaggi sono rispettivamente *ent*-copalil difosfato sintasi (CPS) e *ent*-Kaurene ossidasi (KS).

Nel reticolo endoplasmatico l'*ent*-kaurene è ossidato a GA_{12}/GA_{53} e per azione delle monossigenasi citocromo P459 dipendente: *ent*-Kaurene ossidasi (KO) e *ent*-kaurenoico ossidasi (KAO) formano GA_{12} , la quale è successivamente convertita a GA_{53} , per idrossilazione del carbonio in posizione 13 (GA_{13} ossidasi). GA_{53} è il precursore della via biosintetica delle GAs 13-OH precoce.

Nel terzo stadio GA_{12} e/o GA_{53} sono convertite in diverse strutture intermedie (C_{20} -GAs), precursori delle GAs biologicamente attive (C_{19} -GAs), GA_1 , GA_3 e $GA_{4/7}$. Tutta questa serie di ossidazioni è catalizzata dalle diossigenasi dipendenti dal 2-ossoglutarato: GA_{20} ossidasi ($GA_{20}ox$) e GA_3 ossidasi (GA_3ox)

L'enzima GA_{20} ossidasi converte la GA_{12} in GA_{15} - GA_{24} - GA_9 e la GA_{53} in GA_{44} - GA_{19} - GA_{20} . Il passaggio successivo porta alla formazione delle GAs biologicamente attive rispettivamente GA_4 e GA_1 per mezzo dell'enzima GA 3-ossidasi. In alcune specie, la GA_9 e la GA_{20} sono convertite anche in GA_7 e GA_3 rispettivamente, presumibilmente ad opera sempre della GA 3-ossidasi. L'inattivazione delle GAs biologicamente attive è effettuata dalla GA 2-ossidasi con la produzione di GA_{34} e GA_8 , da GA_4 e GA_1 rispettivamente.

Le due vie biosintetiche, che iniziano con la formazione di GA₁₂ e GA₅₃, sono attive nei tessuti vegetali di molte specie di piante; la predominanza di una di queste dipende presumibilmente dall'attività della GA₁₃ ossidasi (Hedden e Phillips, 2000). In pomodoro la via biosintetica prevalente è quella 13-OH precoce.

In pomodoro sono stati isolati (Rebers et al., 1999) alcuni geni della biosintesi delle GAs: un gene per la copalil difosfato sintasi (*SLCPS*), tre geni per la GA₂₀ ossidasi (*SLGA20ox 1-2-3*) e due per la GA 3 ossidasi (*SLGA3ox 1-2*). Solo recentemente è stata riportata in banca dati la sequenza del gene della GA 2ossidasi (*SLGA2ox-2*).

In *Arabidopsis*, la sovraespressione delle famiglie geniche GA20ox, GA3ox e GA2ox in piante transgeniche, in molti casi altera la concentrazione delle GAs biologicamente attive, indicando che la regolazione di questi geni è cruciale per modulare il flusso di GAs negli ultimi stadi della via biosintetica (Olszewski et al. 2002).

1.4.3. Auxine

La presenza di auxine nel polline, la sua produzione nello stilo e nell'ovario, accompagna la crescita del tubetto pollinico e la fecondazione. L'applicazione esogena di auxine o l'applicazione di cloroflurenolo, un inibitore del trasporto delle auxine, induce la crescita dell'ovario con la produzione di frutti partenocarpici (Robinson et al., 1971). Queste osservazioni suggeriscono che la partenocarpia possa essere la diretta conseguenza di un'alterata regolazione temporale e/o spaziale della sintesi di auxine (Gillaspy et al., 1993). L'analisi dei livelli endogeni di IAA ha dimostrato che durante lo sviluppo del frutto di pomodoro si osservavano due picchi di auxina: a 10 giorni (fase di distensione cellulare) e a 30 giorni dall'antesi (fase di maturazione) (Buta e Spaulding, 1994).

Ovari non impollinati e trattati con acido 2-4 diclorofenossiacetico (2,4-D) mostrano un più rapido incremento di peso rispetto agli ovari trattati con GA₃, suggerendo per le auxine un ruolo predominante, rispetto alle GAs, nell'allegagione e sviluppo del pomodoro (Alabadi et al., 1996). Frutti ottenuti con trattamento ormonale di acido 4-clorofenossi acetico (4-CPA) presentano livelli endogeni di GA₁ più elevati rispetto ai frutti impollinati, 10-14 giorni dopo l'antesi. Questo maggiore livello è stato correlato con le maggiori dimensioni e peso dei frutti trattati (Koshioka et al., 1994).

Diverse ricerche hanno indagato la possibilità di ottenere linee partenocarpiche di pomodoro con la tecnologia del DNA ricombinante. Lo sviluppo dei frutti partenocarpici è stato ottenuto principalmente modulando i livelli auxinici nell'ovario.

L'inserimento del costrutto DefH9-iaaM nel genoma di pomodoro ha portato alla produzione di frutti partenocarpici (Gourguet et al., 2005). Il gene iaaM codifica per l'enzima triptofano monossigenasi che converte il triptofano in indolacetamide precursore dell'IAA (Barg et al., 1996).

DefH9 è un promotore ovulo-specifico di *Antirrhinum majus*, attivo nelle prime fasi dello sviluppo florale (Dorffling, 1982).

Frutti partenocarpici sono stati ottenuti anche in piante trasgeniche per il costrutto TPRP-F₁-rol B. TPRP-F₁ è un promotore ovario-specifico mentre *rolB* è il gene del T-DNA di *Agrobacterium rizogenes* che causa un aumento della produzione di auxine in cellule infettate da questo batterio (Salts et al., 1991).

Il mutante di pomodoro diageotropica (*dgt*) è definito un mutante auxino-resistente. Il fenotipo di questo mutante mostra alterazioni a livello vegetativo e riproduttivo. A livello riproduttivo le alterazioni comportano, dimensioni e peso minori, e modificazioni della forma del frutto, con minore numero di loculi e semi. (Balbi e Lomax, 2003).

1.4.4. Citochinine

Le citochinine sono ormoni coinvolti nelle fasi di divisione e differenziazione cellulare, e la loro azione è spesso mediata dall'interazione con altri ormoni (Mok e Mok, 2001).

Diversi autori hanno analizzato il contenuto di CK in frutti di pomodoro normali e partenocarpici (Varga e Bruisma, 1974; Abdel-Rahman, 1977; Mapelli, 1981 e Bohner e Bangerth, 1988). Sulla base di questi studi, svolti con metodologie non sempre affidabili, alte concentrazioni di CK sono state osservate nei frutti giovani (cinque giorni dopo l'antesi) con Z e ZR come forme prevalenti; inoltre, nei semi il livello di citochinine era più alto di quello del pericarpo (Bohner e Bangerth, 1988). Al contrario i frutti partenocarpici del mutante *pat* sembravano contenere una minore concentrazione di citochinine con iP e iPR come forme prevalenti (Mapelli, 1981).

Studi più recenti (Kojima et al., 2003) nei frutti del mutante partenocarpico *pat-2* riportano la presenza di ZR nel tessuto locale e di Z nelle cellule dei setti.

Sulla base delle informazioni disponibili è stato ipotizzato che le citochinine prodotte nei semi possano diffondere nei tessuti circostanti del frutto con stimolo della divisione cellulare (Gillapsy et al., 1993).

1.4.5. Etilene

L'etilene è stato l'ormone maggiormente studiato nei frutti in considerazione del suo coinvolgimento nel processo di maturazione e senescenza. I livelli di etilene nel frutto sono alti durante la fecondazione e allegagione (fase I), diminuiscono negli stadi successivi, e aumentano di nuovo all'inizio della maturazione del frutto (picco climaterico di etilene) (Lacheene e El-Beltagy, 1986). Questo picco di etilene è associato con la fase climaterica della respirazione (fase IV). Questi studi hanno portato ad una dettagliata ma non ancora completa comprensione del ruolo molecolare dell'etilene nel processo di maturazione del frutto (Giovannoni, 2004).

L'etilene, oltre ad avere un'azione determinante durante la fase di maturazione svolge un ruolo significativo anche all'antesi e durante le prime fasi di sviluppo del frutto. In pomodoro, l'impollinazione promuove la biosintesi dell'etilene negli organi fiorali stimolando l'accumulo di m-RNA dei geni della via biosintetica sono *LeACS-1* e *LeACO-3* (Llop-Tous et al., 2000).

In mais, è stato proposto che l'etilene, l'acido carbossilico amminociclopropano (ACC), il suo precursore, e l'auxina operano come segnali durante l'impollinazione (Mol et al., 2004).

L'auxina induce la sintesi di ACC sintasi e induce l'espressione di alcuni geni della ACC sintasi. L'auxina e l'etilene agiscono insieme durante gli stadi dopo l'impollinazione e questa interazione continua anche durante la crescita vegetativa come ad esempio durante la germinazione, la crescita dell'ipocotile e delle radici (Smalle V. e D. Straeten, 1997).

1.5. Scopo del lavoro

A tutt'oggi i meccanismi genetico-molecolari alla base dell'allegagione e sviluppo del frutto sono scarsamente conosciuti.

Lo scopo di questo dottorato è stato lo studio dell'interazione ormonale nella regolazione degli eventi che si verificano nell'ovario dall'impollinazione/fecondazione fino all'invasiatura. I risultati apportano conoscenze significative sulla fisiologia del frutto di pomodoro, in particolare sul contenuto ormonale di GAs, IAA, CK e etilene, e sull'espressione dei geni della biosintesi delle GAs.

In condizioni colturali sfavorevoli (in serra nel periodo autunno-invernale) gli ormoni sono necessari per ottenere lo sviluppo dell'ovario in frutto. Sono applicati sistematicamente trattamenti ormonali a base di auxina.

L'influenza di questi trattamenti sulla qualità dei frutti partenocarpici così ottenuti non è tuttavia mai stata indagata. Si è ritenuto pertanto utile analizzare i principali parametri qualitativi dei frutti trattati al momento della maturazione commerciale.

2.MATERIALI E METODI

2.1. Materiale vegetale: condizioni di crescita e schema sperimentale

Le piante di pomodoro sono state coltivate in pieno campo nel periodo primaverile-estivo seguendo le tecniche convenzionali d'allevamento. Il genotipo utilizzato è stato *Solanum lycopersicon* cv. *Pearson*.

Lo schema sperimentale prevedeva la suddivisione delle piante in tre gruppi:

- Piante di controllo
- Piante emasculate e impollinate
- Piante emasculate e trattate con auxina sintetica

L'emasculazione è stata effettuata un giorno prima dell'antesi in corrispondenza dello stadio fenologico denominato “riflesso del petalo”, che è definito come il momento in cui un petalo comincia a piegarsi a 90° rispetto all'asse del pedicello; il tutto avviene un giorno prima dell'antesi (Jacobsen e Olszewski, 1991), mentre la deiscenza delle antere avviene 24-48 ore dopo l'antesi (Fig. 1)



Fig.1 Stadio fenologico denominato “riflesso del petalo”

Il trattamento auxinico è stato effettuato con l'acido 4-clorofenossiacetico (4-CPA), il composto ormonale maggiormente impiegato per indurre frutti partenocarpici nel pomodoro. (Koshioka et al., 1994; Kataoka et al., 2003) La quantità da applicare è stata definita a seguito di prove preliminari utilizzando diverse concentrazioni di 4-CPA: 10- 15 –20 mg/l in presenza di Tween 20 (0.1% volume/volume). La concentrazione di 15 mg/l è stata molto efficace nell'indurre la partenocarpia ed è stata quindi impiegata nella sperimentazione successiva. Lo stigma dei fiori emasculati era immerso nella soluzione di 4-CPA per alcuni secondi.

L'impollinazione manuale era eseguita prelevando il polline dalle antere collocandolo sullo stigma con l'aiuto di un lapis.

2.2. Raccolta del materiale per le analisi ormonali

Il giorno d'emasculazione del fiore è stato definito 1-DBA (1 giorno prima dell'antesi), mentre i successivi prelievi sono stati indicati come X-DAT (x giorni dopo il trattamento) e X-DAP (x giorni dopo l'impollinazione manuale).

Il prelievo del materiale ha seguito quindi lo schema seguente:

- 1-DBA ovario
- 3-DAT e 3-DAP frutto intero
- 6-DAT e 6-DAP frutto intero
- 9-DAT e 9-DAP frutto intero
- A 15, 21, 27 DAP/DAT i tessuti del frutto sono stati separati in: pericarpo, tessuto locale e semi (DAP) o pseudoembrioni (DAT).

Le frazioni dei semi/ pseudoembrioni erano contaminate dalla presenza di frammenti di tessuto locale.

Dopo la raccolta, i frutti interi sono stati congelati con azoto liquido e conservati a -80°C fino all'analisi, mentre i tessuti separati sono stati conservati immersi in MeOH all'80% con 5mM di DTT a -20°C fino all'analisi.

2.3. Analisi dei fitormoni endogeni

I campioni raccolti sono stati estratti per analizzare i livelli endogeni delle seguenti classi ormonali:

- Gibberelline: GA₁₉\ GA₂₀\ GA₁\ GA₈\ GA₅\ GA₃
- Auxine: acido indol-3-acetico (IAA)
- Citochine: zeatina (Z), diidrozeatina (DHZ), zeatina riboside (ZR), diidrozeatina riboside (DHZR), isopentenil adenina (iP) e isopentenil adenosina (iPR)
- Etilene

2.3.1. Protocollo sperimentale per l'analisi delle gibberelline e dell'acido indolacetico

I campioni vegetali sono stati analizzati seguendo il protocollo di analisi riportato in fig. 2.

-Estrazione: i campioni conservati a -80°C sono stati omogenizzati in mortaio con metanolo all'80% con un rapporto d'estrazione 1:5 (peso/volume). Agli omogenati sono stati aggiunti i seguenti standard interni deuterati: 17,17-D₂-GA₁, 17,17-D₂-GA₃, 17,17-D₂-GA₅, 17,17-D₂-GA₈, 17,17-D₂-GA₁₉, 17,17-D₂-GA₂₀ e ¹³C₆-IAA lasciandoli in agitazione a 4°C. Dopo quattro ore i campioni erano centrifugati a 4000 x g per 15' a temperatura ambiente. I surnatanti sono stati conservati a 4°C, mentre i residui solidi sono stati estratti nuovamente per altre 3 volte a 4 °C.

I surnatanti sono stati ridotti di volume e il pH è stato aggiustato a 2.8-3 (con HCl 0.1N).

-Partizioni: i surnatanti sono stati successivamente sottoposti a quattro partizioni con un egual volume di etil-acetato saturo d'acqua. Le fasi organiche sono state portate a secco con evaporatore rotante ed eluite con il solvente iniziale utilizzato per l'analisi all'HPLC.

-HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione): l'analisi è stata effettuata con uno strumento della ditta Kontron mod. Pump 422. La colonna impiegata era una Nucleosil 100-5 N (CH₃)₂ (Macherey-Nagel) 250 x 4.6 mm ID con particelle di 5µm, eluita isocraticamente ad un flusso di 1 ml · min⁻¹ con 0.1% CH₃COOH in MeOH, il

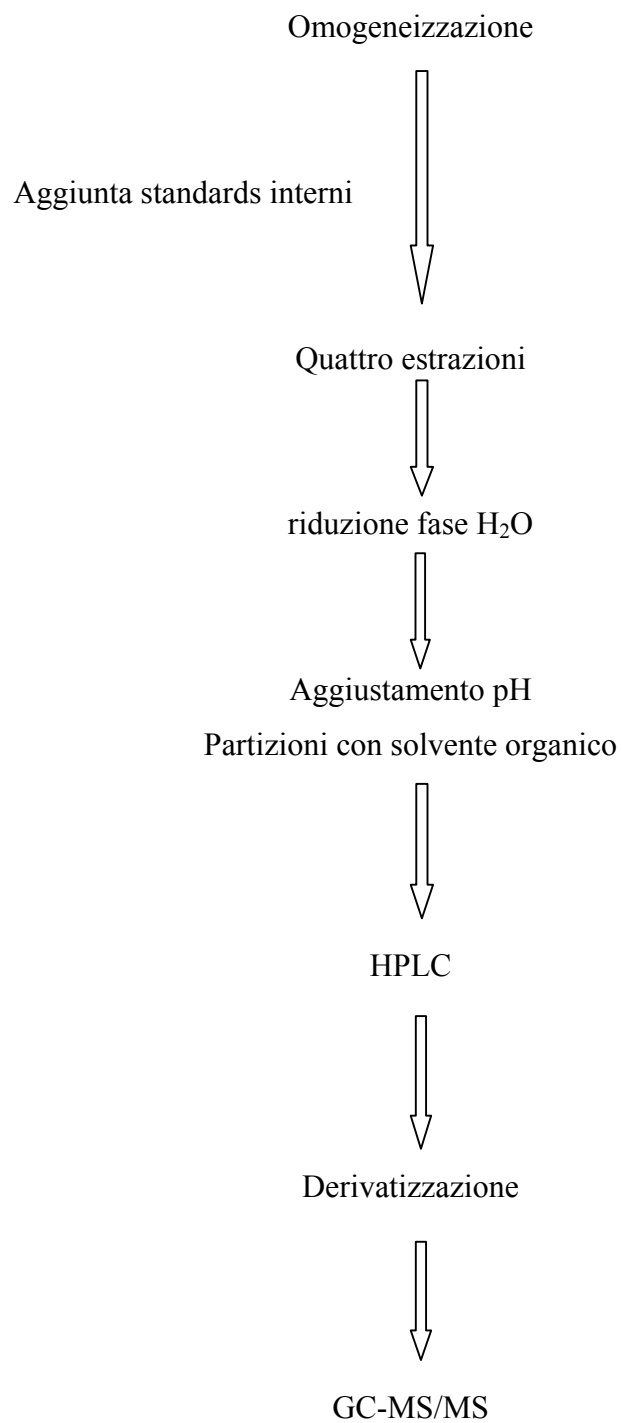


Fig. 2 Schema del protocollo analitico per l'analisi delle GAs e IAA

detector era impostato ad una $\lambda = 214$ nm. Nella colonna la separazione degli analiti era in fase reversa; le condizioni di analisi sono state messe a punto con gli standards.

Le frazioni raccolte sono state portate a secco e derivatizzate con 15 μ l di N,O-bis (trimetil-silil) trifluoroacetamide (BSTFA) con 1% trimetilclorosilano (TMCS) a 80°C per un ora prima dell'analisi alla GC/MS/MS.

-GC/MS/MS: per l'analisi dei campioni è stato utilizzato uno spettrometro di massa modello Saturn 2200 quadrupolo a trappola ionica abbinato ad un gas cromatografo CP-3800 (Varian) (GC/MS/MS). Lo strumento era equipaggiato con una colonna capillare "varian Factor Four" (30 m x 0.25 mm i.d.), contenente una fase stazionaria costituita da 5% fenile e 95% dimetilpolisilossano. Durante le analisi la temperatura del forno era mantenuta inizialmente a 80°C per 2 min.; seguiva un gradiente termico con il seguente andamento: da 80-215°C in 4.30 min., da 215-219°C in 2 min., da 219-240°C in 1 min., da 240-250°C in 10 min., da 250-300°C in 2 min. Il gas di trasporto era costituito da elio con un flusso di 1ml/min, la temperatura della trappola ionica era fissata a 200°C. Le molecole erano ionizzate per impatto elettronico con un'emissione di corrente di 10 μ A e con una modulazione assiale di 4V. La corrente ionica totale è stata acquisita da 100-350 Da per l'IAA, da 200-650 Da per le GAs con una velocità di 3 microscansioni al secondo. Gli analiti sono stati identificati sulla base degli spettri di massa.

La quantificazione è stata ottenuta confrontando l'area del picco cromatografico prodotta dagli ioni più abbondanti dell'analita con quella degli ioni corrispondenti degli standards deuterati aggiunti al campione.

Gli ioni monitorati per l'identificazione e quantificazione degli analiti sono stati:

- GA_1 : m/z 564(M^+), 447(M^+-117); per D_2GA_1 : m/z 566, 449,
- GA_8 : m/z 535 (M^+-117); per D_2GA_8 : m/z 537,
- GA_5 : m/z 474(M^+), 357(M^+-117); per D_2GA_1 : m/z 476, 359,
- GA_{19} : m/z 563(M^+), 460(M^+-103); per D_2GA_{19} : m/z 565, 462,
- GA_3 : m/z 562(M^+), 445(M^+-117); per D_2GA_3 : m/z 447 e 564;
- IAA: m/z 319 (M^+), 202(M^+-117); per C_6IAA : m/z: 325, 208.

Per ogni campione sono state effettuate almeno tre analisi al GC/MS.

In figura 3 sono riportati lo spettro di massa, i cromatogrammi degli ioni più abbondanti della GA_1 endogena (564, 447) e GA_1 deuterata (566, 449) in un campione di frutto di pomodoro. Nella figura 4 sono riportati i cromatogrammi degli ioni più

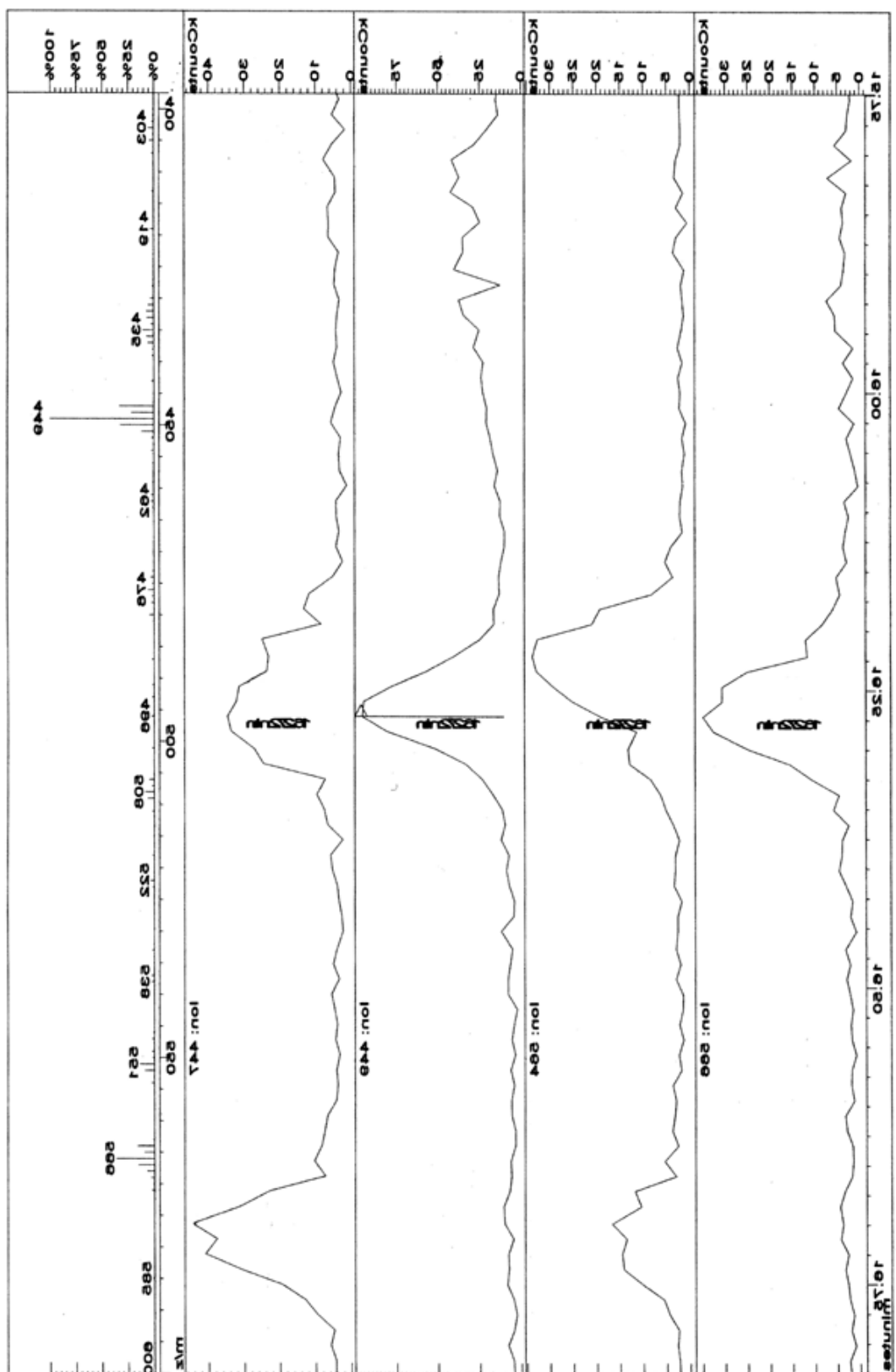


Fig.3 Cromatogrammi e lo spettro di massa relativi ad una analisi con GC/MS per l'identificazione e quantificazione della GA₁

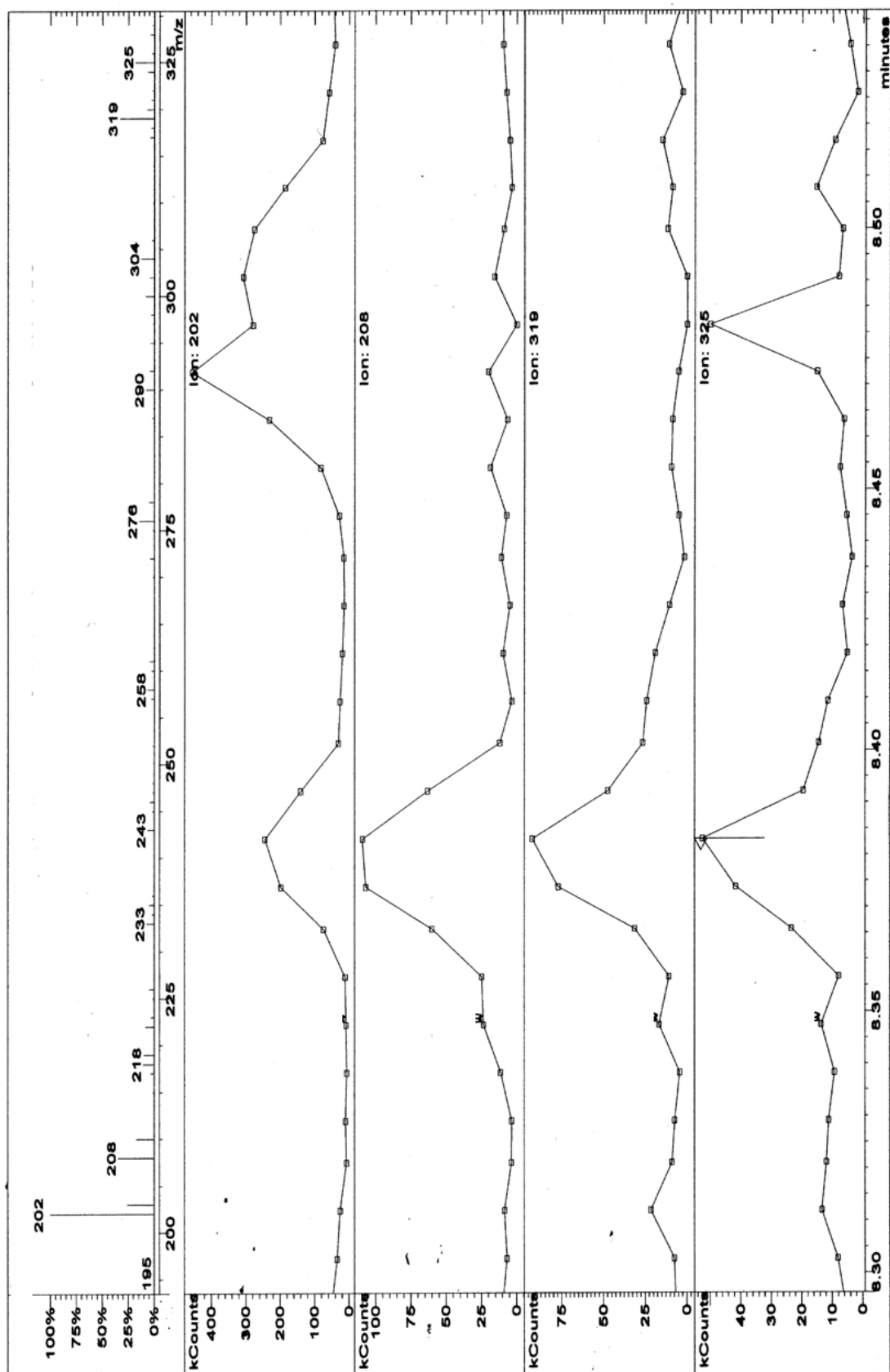


Fig. 4 Cromatogrammi e lo spettro di massa relativi ad una analisi con GC/MS di un campione vegetale di pomodoro per l'identificazione e quantificazione dell'IAA.

abbondanti dell'IAA endogeno (202, 319), dell'IAA arricchito con sei atomi di carbonio (208, 325) e lo spettro di massa relativo ad una analisi al GC/MS di un campione di frutto di pomodoro.

2.3.2. Protocollo sperimentale per l'analisi delle citochinine

-Estrazione: i frutti sono stati omogenizzati in mortaio (schema fig. 5) con la miscela di solventi di Bielecki (12 MeOH: 5 cloroformio: 2 acqua: 1 acido formico) con un rapporto di estrazione 1:6 (peso/volume) per 12 ore a -20°C . Negli omogenati dei campioni sono stati aggiunti i seguenti standard interni deuterati: D3-diidrozeatina (D3-DHZ), D3-diidrozeatina riboside (D3-DHZR), D5-zeatina (D5-Z), D5-zeatina riboside (D5-ZR), D6-isopenteniladenina (D6-iP), D6-isopenteniladenosina (D6-iPR), D6-isopenteniladenosina-5'-monofosfato (D-iPMP). I campioni sono stati centrifugati a 16000g per 20 min. a 4°C . Il precipitato è stato riestratto per altre due volte con lo stesso solvente con un rapporto 1:3 (peso/volume) a 4°C per quattro ore.

-Partizione: dopo aver aggiunto $\frac{1}{4}$ di volume di acqua (H_2O), i surnatanti erano centrifugati a 1500g per 5 min. a temperatura ambiente, l'upper phase era raccolta e portata a secco con evaporatore rotante.

I campioni sono stati rieluiti con 6 ml di H_2O a $\text{pH}=7$ e caricati su colonne da cromatografia a scambio ionico DEAE- cellulosa (Sigma) per separare le basi libere, i ribosidi dai nucleotidi. I primi sono stati eluiti con 18 ml di H_2O a $\text{pH}=7$ mentre i secondi con 24 ml di bicarbonato di ammonio 1M. I campioni portati a secco sono stati rieluiti con il solvente iniziale del HPLC.

-HPLC: L'analisi all'HPLC è stata effettuata con uno strumento Milton Roy mod. Constametric. La colonna utilizzata per la cromatografia era una Kromasil (EKA Nobel) C18 150 x 4.6 mm ID con particelle di $5\mu\text{m}$, eluita ad un flusso di $1\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ con H_2O e 0.1% di CH_3COOH in MeOH secondo le seguenti condizioni: eluizione isocratica con 10% MeOH per 4 min. seguita da due gradienti lineari dal 10% al 30% e dal 30 % al 100% di metanolo entrambi in 20 min. Il rilevatore era impostato ad una $\lambda = 254\text{ nm}$. Le condizioni di analisi sono state messe a punto con standards delle citochinine.

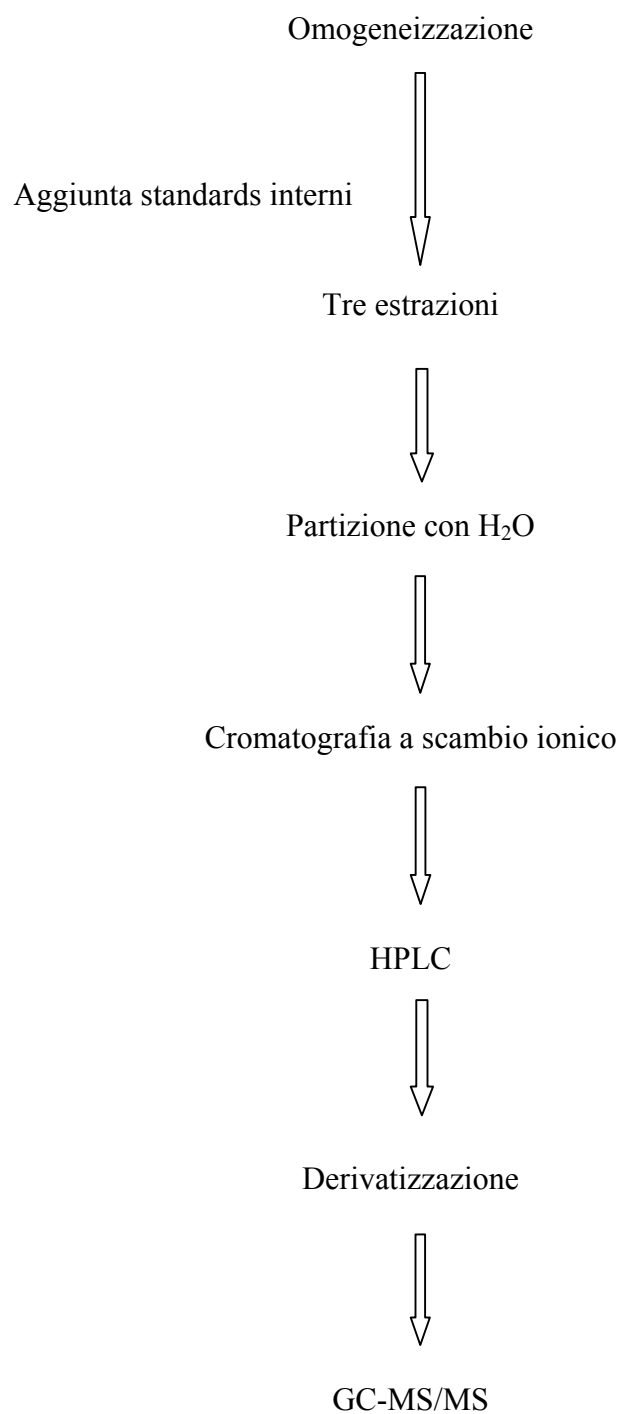


Fig. 5 Schema del protocollo analitico per l'analisi delle CK

Le frazioni raccolte sono state portate a secco e derivatizzate con 10µl di N,O-bis (trimetil-silil) trifluoroacetamide (BSTFA) con 1% trimetilclorosilano (TMCS) a 80°C per un ora prima dell'analisi alla GC/MS/MS.

-GC/MS: le caratteristiche tecniche dello strumento utilizzato sono state già descritte nel paragrafo 2.3.1. Le condizioni cromatografiche erano le seguenti: 120°C per 2 min., da 120-300°C in 9 min. mentre gli ioni monitorati per l'identificazione e quantificazione degli analiti erano:

-iP: m/z 347(M⁺), 260(M⁺-15); per D₆iP: m/z 353, 263,
-Z: m/z 347(M⁺-89), 420(M⁺-15); per D₅Z: m/z 353, 425,
-iPR: m/z 551(M⁺), 536(M⁺-15); per D₆iPR: m/z 557, 539,
-DHZ: m/z 366(M⁺-71), 422(M⁺-15); per D₅DHZ: m/z 369, 425,
-ZR: m/z 536(M⁺-103), 549(M⁺-90); per D₅ZR: m/z 539, 554,
-DHZR: m/z 551(M⁺-90), 626(M⁺-87); per D₅DHZR: 554e 629.

2.3.3. Protocollo sperimentale per l'analisi dell'etilene

Per l'analisi dell'etilene è stato utilizzato uno strumento HP 5890 (Hewlett Packard) equipaggiato con una colonna in acciaio (1.5m x 4mm i.d.) impaccata con una fase stazionaria HaySept T e rivelatore con ionizzazione di fiamma. Il materiale raccolto era chiuso in contenitori di vetro a tenuta ermetica con setto di caucciù. Dopo 1 ora sono state prelevate aliquote di aria, con delle siringhe, dai contenitori e iniettate nel GC. Le condizioni cromatografiche erano: forno a temperatura costante di 70°C; il rivelatore: 350°C, gas di trasporto: azoto con una velocità di 30ml/min.

La produzione di etilene nei campioni è stata determinata utilizzando una curva di taratura costruita con diverse concentrazioni note di etilene.

La quantità di etilene prodotta dai campioni è stata riportata in nl gr⁻¹ p.f. h⁻¹.

2.4. Espressione dei geni del metabolismo delle gibberelline

Il materiale utilizzato per questo studio è stato prelevato a 0, 3, 6, 9 giorni dall'impollinazione/trattamento.

Il materiale raccolto è stato separato in pericarpo e tessuto locale e rapidamente congelato in azoto liquido. I campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

-Estrazione e purificazione dell'RNA totale: l'RNA totale è stato estratto e purificato utilizzando il Kit "RNAqueous kit®" (Ambion).

Il materiale vegetale, circa 100mg, era omogenizzato in un mortaio con 800 μL della "soluzione di lisi" e centrifugato a 10000g per 5 min. a temperatura ambiente. Il surnatante era addizionato di un eguale volume di etanolo al 64% e caricato su di un filtro e centrifugato a 14000g per 30 sec. a temperatura ambiente. Il filtro era lavato con due diverse soluzioni "soluzione di lavaggio 1 e 2/3" (700 μL ciascuno). L'eluizione dell'RNA dal filtro è stata effettuata con 60 μL di una "soluzione di eluizione" a 96°C previa incubazione di 1 min. e successiva centrifugazione a 11000g per 30 sec. a temperatura ambiente. La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state testate tramite elettroforesi su gel di agarosio al 1% e tramite lettura dell'assorbanza di due lunghezze d'onda $\lambda = 260\text{nm}$ (A_{260} massima assorbanza del RNA) e $\lambda = 280\text{nm}$ (A_{280} massima assorbanza DNA) allo spettrofotometro.

La quantità di RNA, espressa in ng/ μL è stata calcolata applicando la formula:

- $[\text{RNA}] = A_{260} \times \text{fattore di diluizione} \times 40$.

Un valore di assorbanza pari a 1 a una lunghezza d'onda di 260 nm corrisponde infatti a 40 μg di RNA per ml ($A_{260} = 1 = 40\mu\text{g/ml}$). Il rapporto tra le letture dell'assorbanza a 260nm e a 280nm fornisce una stima della purezza dell'RNA: RNA puro presenta infatti un rapporto A_{260}/A_{280} compreso tra 1,9 e 2,1.

-Trattamento con DNA-asi: tale trattamento ha lo scopo di eliminare tracce di DNA presenti nell'estratto. I campioni di RNA totale sono stati trattati con la DNA-asi secondo il protocollo del kit (*Turbo DNA-asi free®*, Ambion).

La miscela di incubazione era formata da: 5 μL di buffer 10X, 1 μL di enzima DNA-asi (2 unit/ μL), RNA, H_2O DEPC (dietil pirocarbonato) per un volume finale di 50 μL . L'incubazione è stata effettuata a 37°C per 30 min.. La reazione era bloccata aggiungendo 1/10 del volume totale della "soluzione di inattivazione". Dopo la centrifugazione a 10000g per 1.5 min. a temperatura ambiente è stato raccolto il surnatante.

-Retrotrascrizione: L'RNA purificato è stato retrotrascritto a cDNA mediante il kit “*High Capacity cDNA Archive kit®*” (Applied Biosystems). La miscela di reazione era formata da: 40µl di RNA purificato, 10µl di RT buffer 10X, 10µL di primer casuali 10X (inneschi costituiti da brevi sequenze di DNA), 4µl di una miscela di dNTP 25X (nucleotidi da polimerizzare sotto forma di deossiribonucleotidi trifosfati), 5µl di enzima (MultiScribe RT enzyme 50unit/µl) e acqua RNA-asi free per portare a volume di 100µl. Le condizioni del termociclatore, per quanto riguarda la temperatura di amplificazione, erano le seguenti: temperatura iniziale a 25°C per 10' per poi aumentare a 37°C per 2 ore.

-Real Time PCR: questo strumento permette di quantificare il livello di espressione genica relativa tramite un controllo interno (confronto dell'espressione del gene in esame con quella di un gene definito *housekeeping*). Tale gene, che nel nostro caso era un fattore di allungamento di pomodoro (*LeEF1α*, a: n° X64562) (Anjanasree et al., 2005) è generalmente espresso in modo costante in tutte le parti della pianta. In questo modo è possibile avere un valore di espressione relativa rispetto a quella del gene *housekeeping* preso in esame. I geni presi in esame sono stati:

- *SlGA20ox-1* a. n° AF049898;
- *SlGA20ox-2* a. n° AF049899;
- *SlGA20ox-3* a. n° AF04900;
- *SlGA3ox-1* a. n° AB010991;
- *SlGA3ox-2* a. n° AB010992.

I confronti tra le sequenze presenti nella banca dati GenBank (consultabile all'indirizzo: www.ncbi.nlm.nih.gov) sono state effettuate con il software “BLASTN 2.2.6.”(<http://ted.bti.cornell.edu>) e con CLUSTAL W 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk>).

Per ciascun gene è stata disegnata una sonda Taqman specifica. Le sequenze di tali sonde sono riportate in tabella 1.

Ciascuna sonda Taqman è costituita da una sequenza single strand in grado di riconoscere una regione specifica del gene ed è composta da due primers (senso e antisenso) e una sonda.

L'amplificazione e la rivelazione della fluorescenza sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti mediante lo strumento ABI Prism 7000 equipaggiato con detector laser a ioni argon e termociclatore PE.

In posizione 5' la sonda è marcata con una particolare molecola denominata fluoroforo, che emette fluorescenza se irradiata con un fascio di luce ad una determinata lunghezza d'onda, mentre in posizione 3' è legata ad una molecola detta "quencher", che con la sonda intatta, ne maschera la fluorescenza. La sonda riconosce la parte omologa all'interno del c-DNA e vi si lega mentre, la Taq polimerasi amplifica la sequenza a partire dal primer senso con attività 5' -> 3' fino ad incontrare la sonda appaiata al cDNA (fase di polimerizzazione). A questo punto la Taq polimerasi è in grado di degradare la sonda man mano che avanza nella formazione del nuovo filamento liberando il fluoroforo dal mascheramento operato dal "quencher" e rendendo quindi possibile l'emissione di fluorescenza in modo proporzionale all'andamento dell'amplificazione.

Oltre ai campioni, è stato utilizzato un controllo per evitare di avere falsi positivi, costituito da sola acqua.

La miscela di reazione era formata da: 10µl di buffer 2X (*TaqMan Universal PCR Master Mix*®, Roche), 1µl di una miscela di primer e sonda specifici del gene 20X (*TaqMan gene Expression Assays* ®, Applied biosystems), 200ng di cDNA del campione da analizzare e µl di *water molecular biology reagent* (Sigma) per volume finale di 20µl.

La reazione di amplificazione è avvenuta seguendo le seguenti condizioni: una prima fase a 50° per 2 min. che ha la funzione di attivare l'enzima uracil-N-glicosilasi, presente nella miscela di reazione, il quale è attivo solo a 50°C e in grado di degradare qualunque amplificato contenente la base uracile che può contaminare il campione nella fase successiva a 95°C per 10 min. La miscela utilizzata per l'amplificazione, infatti, non contiene la base timidina ma solo l'uracile. Una terza fase costituita da 40 cicli di denaturazione, 95°C per 15 sec. e di amplificazione, 60°C per 1 min. Il calcolo del livello di espressione relativo di ciascun gene in relazione al suo controllo interno, è fatto utilizzando il metodo comparativo Ct come descritto nel manuale illustrativo "*ABI Prism 7700 Sequence System User Bulletin# 2*" (Applied Biosystem).

Nome della sonda	Lunghezza (bp)	Descrizione	Sequenza 5'-3'
<i>SIGA20ox-1</i>	29	TaqMan probe	ACTACTACACAAGCT TAAGAGCTACAAGA
<i>SIGA20ox-2</i>	27	TaqMan probe	ACGGAAATTTAAGGC ATACTAAGAAGT
<i>SIGA20ox-3</i>	26	TaqMan probe	TGTGGACATAGAAAT GGAACCTCATG
<i>SIGA3ox-1</i>	30	TaqMan probe	TCAATTAAAGAATTA CCAGAATCCCATGCA
<i>SIGA3ox-2</i>	28	TaqMan probe	GGCGTCCAAGTAGGT TAATATAACAAGA

Tab.1 Sequenze (5'-3') delle sonde gene specifiche utilizzate per la reazione di Real-Time PCR

2.5. Analisi di alcuni parametri qualitativi

Le analisi sono state effettuate su frutti raccolti cinquanta giorni dopo l'impollinazione/trattamento (stadio di maturazione "red") e su frutti tenuti quattro giorni e temperatura ambiente, in modo da simulare il periodo che può trascorrere tra la raccolta e l'acquisto del prodotto da parte del consumatore.

Nei frutti maturi sono stati analizzati i seguenti parametri:

- peso
- consistenza della polpa
- solidi solubili
- acidità titolabile
- concentrazione di licopene
- concentrazione di β -carotene
- concentrazione di ascorbato totale, ridotto e ossidato.

➤ Peso

Il materiale prelevato per effettuare le analisi è stato preventivamente pesato per valutare la differenze di accrescimento dei due tipi di frutti.

➤ **Consistenza della polpa**

La consistenza della polpa è stata misurata con il penetrometro effettuando due misurazioni: una nella porzione apicale e una nella porzione mediana del frutto.

I frutti interi erano omogeneizzati con un omogenizzatore e l'omogenato è stato utilizzato per la determinazione dei parametri qualitativi.

➤ **Solidi solubili**

L'omogenato era centrifugato a 13000 g per 20 min. a 8°C. I gradi brix erano misurati direttamente con il rifrattometro sul surnatante (George et al., 2004).

➤ **Acidità titolabile**

A 6 gr del surnatante erano aggiunti 50 ml di acqua. Si procedeva quindi alla titolazione con NaOH 0.1 N fino a pH 8.2. L'acidità era espressa come grammi di acido citrico equivalente (George et al., 2004).

➤ **Licopene e β -carotene**

6 gr dell'omogenato erano estratti con 60 ml di una miscela di esano-MeOH-acetone (2:1:1 volume/volume/volume) con 2.5% di BHT per 30' a 4°C, al buio. Erano quindi aggiunti 10 ml di H₂O, recuperata la fase apolare (esano) sulla quale era infine eseguita una misura di assorbanza a 472 nm (picco massimo di assorbanza del trans-licopene), 502nm (picco massimo di assorbanza del cis-licopene) (Martinez-Valverde et al., 2002; George et al., 2004) e 453nm (massima assorbanza del β -carotene) (Bohm et al., 2002)

➤ **Ascorbato ridotto, ossidato e totale**

Il materiale vegetale era omogeneizzato con HClO₄ 0.2 M (1:0.5 peso/volume), centrifugato a 14000 x g per 20 min. a 8°C e il surnatante conservato a -20°C fino alla analisi.

Per la determinazione dell'ascorbato totale era preparata la seguente miscela in un volume finale di 1 ml:

-20 μ L di campione

-320 μ L di tampone K₂HPO₄/KH₂PO₄ 150 mM a pH 7.2 contenente EDTA K₂ 5 mM

-50 μ L di DTT 10 mM

La soluzione era quindi incubata per 10 min. a temperatura ambiente prima di aggiungere gli altri componenti.

-50 μ L di N-etilmaleimide al 5%

-100 μ L di H₂O

-200 μ L di acido trifluoroacetico al 10%

-200 μ L di acido ortofosforico al 44%

-100 μ L di dipiridil al 4% (peso/volume) e FeCl₃ 0.3% (peso/volume) disciolti in una miscela di alcol etilico e acqua (7/3)

Per la determinazione dell'ascorbato ridotto non si aggiungevano il ditiotreitolo e l'N-etilmaleimide, che erano sostituiti con acqua.

Questa miscela era tenuta a 40 °C per 40 min. e, al termine, era effettuata una misurazione di assorbanza a 525 nm (De Pinto et al., 1999).

L'ascorbato ossidato era determinato nel seguente modo: asc.totale-asc. ridotto.

3. RISULTATI

3.1. Analisi ormonale

3.1.1. Livelli endogeni delle GAs

La via biosintetica prevalente in pomodoro è la 13 OH-precocce (Koshioka et al., 1994; Fos et al., 2000), quindi negli ovari e nei frutti di pomodoro sono state indagate le seguenti GAs: GA₁₉, GA₂₀, GA₁, GA₈, GA₃, GA₅ e GA₂₉.

I livelli endogeni delle GAs identificate negli ovari al tempo 0 (1DBA), sono riportati in figura 1A. Sono state identificate GA₂₀, GA₁ e GA₈ con il livello di GA₁, circa 30ng g⁻¹ p.f. prevalente sulle altre GAs. I livelli di GA₁₉, GA₃ e GA₅ sono risultati al di sotto del limite di sensibilità dello strumento.

Confrontando i livelli endogeni delle GAs nei frutti dopo tre giorni dall'impollinazione/trattamento (Fig. 1B), possiamo notare che i livelli di GA₈ e di GA₃, sono notevolmente più alti nei frutti trattati. La GA₈ (GA biologicamente inattiva) è circa 3.5 volte più alta (42.93 ng g⁻¹ p.f. nei frutti trattati- 12.43 ng g⁻¹ p.f. nei frutti impollinati) mentre il livello di GA₃ (GA biologicamente attiva) è circa 15 volte più alto (26.29 ng g⁻¹ p.f. nei frutti trattati- 1.73 ng g⁻¹ p.f. nei frutti impollinati). Per quanto riguarda le altre GAs, differenze significative tra i due tipi di frutti si osservano per GA₁ e GA₅: il livello di queste due GAs è leggermente più alto nei frutti trattati.

In fig. 1C sono riportati i livelli endogeni delle GAs nei frutti dopo sei giorni dall'impollinazione/trattamento. A questo stadio di sviluppo, le differenze più significative tra i due tipi di frutti si osservano a carico di GA₂₀, GA₁ e GA₈. Nei frutti trattati, i livelli di GA₁ sono più elevati (49.98 ng g⁻¹ p.f.) dei frutti impollinati (13.27 ng g⁻¹ p.f.), mentre i livelli di GA₂₀ (precursore di GA₁, biologicamente attiva) nei frutti impollinati (21.38 ng g⁻¹ p.f.) sono 5 volte più elevati rispetto ai frutti trattati (3.83 ng g⁻¹ p.f.). Il livello di GA₈ nei frutti trattati è 6.08 ng g⁻¹ p.f. mentre è al di sotto del limite di determinazione nei frutti impollinati. Non sono emerse differenze significative tra i due tipi di frutti nei livelli endogeni di GA₁₉ e GA₅ mentre la GA₃ è stata identificata nei soli frutti impollinati.

I risultati dei livelli endogeni di GAs nei frutti dopo 9 giorni dall'impollinazione/trattamento sono riportati in fig.1D. Nei frutti impollinati le concentrazioni di GA₂₀ (12.44 ng g⁻¹ p.f.) e GA₈ (22.12 ng g⁻¹ p.f.) sono

significativamente diverse da quelle rilevate nei frutti trattati (GA_{20} 1.39 ng g⁻¹ p.f., GA_8 7.33 ng g⁻¹ p.f.).

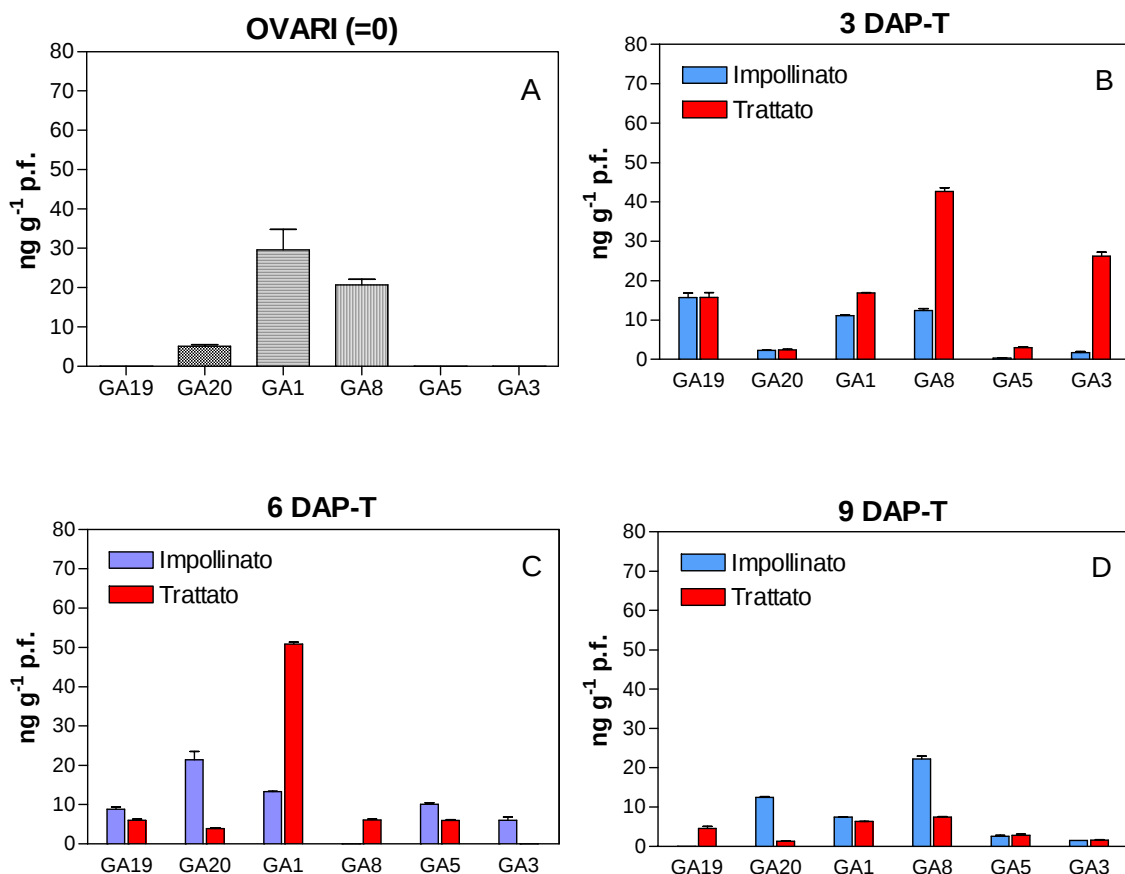


Fig.1 Livelli endogeni di GAs nei frutti durante i primi 9 giorni di sviluppo dopo impollinazione o trattamento auxinico. (DAP: giorni dall'impollinazione; DAT: giorni dal trattamento auxinico)

A partire da 15 giorni dall'impollinazione/trattamento i livelli endogeni di GAs sono stati analizzati nei singoli tessuti del frutto. I risultati sono riportati in figura 2.

Dopo 15 giorni dall'impollinazione/trattamento nei frutti impollinati i livelli di GA_1 (68.91 ng g⁻¹ p.f.), GA_8 (41.06 ng g⁻¹ p.f.) e GA_{20} (28.66 ng g⁻¹ p.f.) sono complessivamente, nel frutto intero, più alti rispetto ai frutti trattati (15.31 ng g⁻¹ p.f., 20.08 ng g⁻¹ p.f., 8.63 ng g⁻¹ p.f.). I livelli più alti sono presenti nei semi e nel tessuto locale. (Fig.2A-B).

Dopo 21 giorni dall'impollinazione/trattamento differenze significative si osservano a carico dei livelli di GA_{19} , GA_{20} e GA_1 . La concentrazione di queste GAs nei frutti trattati risulta più bassa rispetto ai frutti impollinati; anche a questo stadio di sviluppo, i livelli più elevati si riscontrano nei semi e nel tessuto locale (Fig.2C-D).

In figura 2E-F sono riportati i livelli endogeni di GAs nei frutti 27 giorni dopo impollinazione/trattamento. A questo stadio i frutti impollinati mostrano concentrazioni superiori di GAs soprattutto per quanto riguarda la GA_1 . Come si può notare dalla figura la differenza è attribuibile quasi completamente al livello di GA_1 nel tessuto locale, ben 17 volte maggiore nei frutti impollinati rispetto ai frutti trattati ($73.61 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti impollinati, $4.19 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti trattati). Anche il livello di GA_1 nei semi appare più elevato nei frutti impollinati rispetto a quelli trattati ($11.61 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti impollinati, $5.69 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti trattati).

In figura 3 sono illustrati i livelli endogeni delle diverse GAs durante lo sviluppo del frutto.

GA_{19} : la dinamica dei livelli endogeni di questa GA si presenta molto simile nelle due tesi ad eccezione dello stadio 21 DAP/T dove il livello nei frutti impollinati è oltre il doppio dei frutti trattati ($43.53 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti impollinati, $19.14 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti trattati).

GA_{20} : i livelli endogeni di questa GA appaiono significativamente più elevati in quasi tutti gli stadi di sviluppo del frutto impollinato in particolare 6- 15 DAP/DAT.

GA_1 : il livello endogeno di questa GA risulta molto diverso tra le due tesi (Fig.3C). Nei frutti trattati si nota un picco dopo 6 giorni, mentre nei frutti impollinati la concentrazione endogena rimane bassa. La situazione si capovolge negli stadi successivi, nei quali il livello endogeno di GA_1 appare costantemente più elevato nei frutti impollinati rispetto ai frutti trattati fino a risultare 8 volte più elevato 27 DAP/T ($88.64 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti impollinati, $11.37 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ nei frutti trattati).

GA_8 : la dinamica dei livelli endogeni nei due tipi di frutti è simile inizialmente a quella di GA_1 mentre negli stadi successivi (21 e 27 DAP/T) il livello endogeno nei frutti impollinati cala raggiungendo quello dei frutti trattati.

GA_5 e GA_3 : i livelli endogeni di queste due GAs rimangono sempre bassi durante tutto lo sviluppo del frutto e non presentano differenze significative tra frutti impollinati e frutti trattati con l'eccezione di un picco di GA_3 nei frutti trattati dopo 3 giorni dal trattamento ($26.29 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$).

GA_{29} : il livello endogeno di questa GAs è risultato sotto il limite di sensibilità dello strumento.

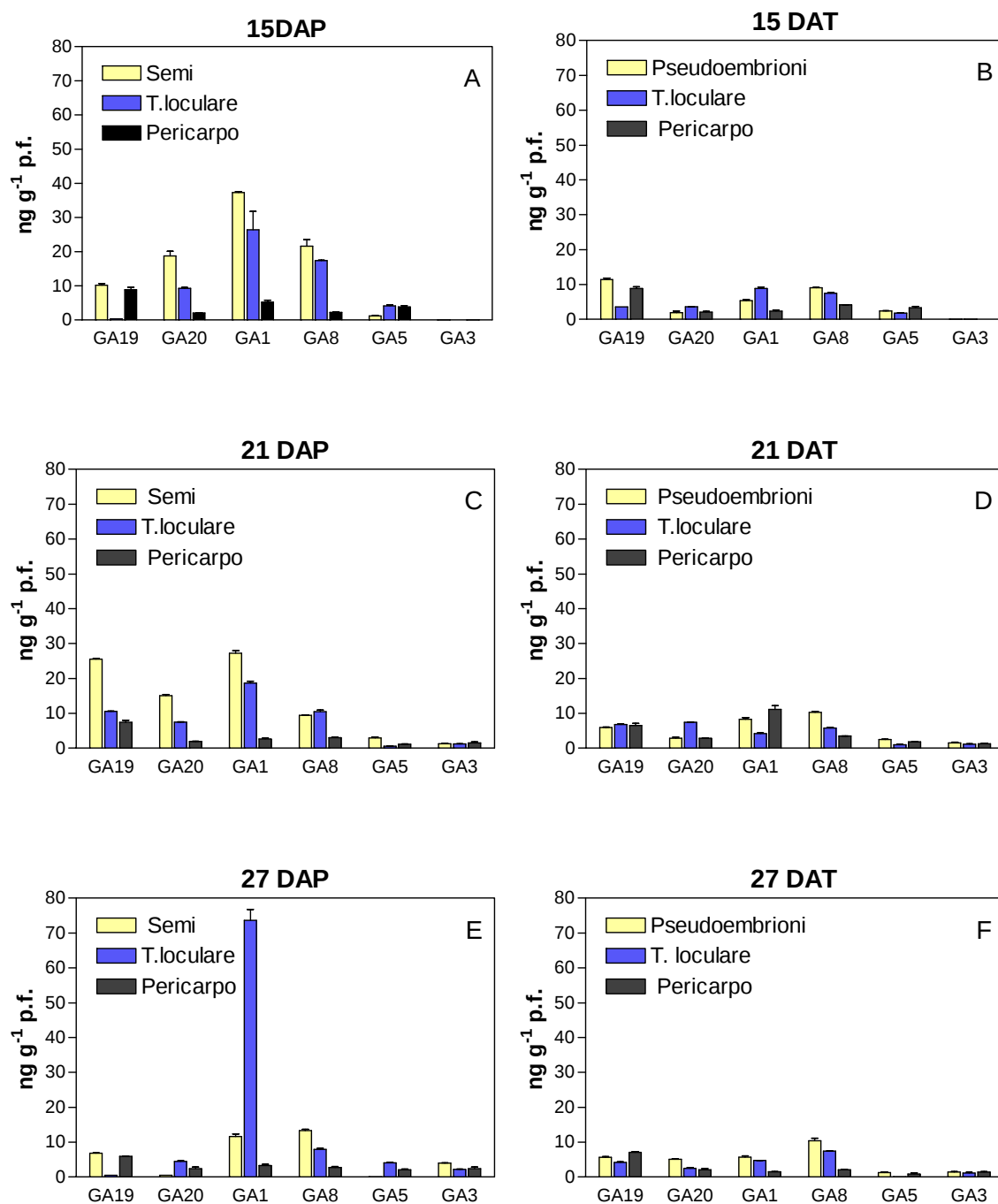


Fig. 2 Livelli endogeni di GA nei diversi tessuto del frutto durante le fasi di sviluppo da 15 a 27 DAP/DAT. (DAP: giorni dall'impollinazione, DAT: giorni dal trattamento auxinico)

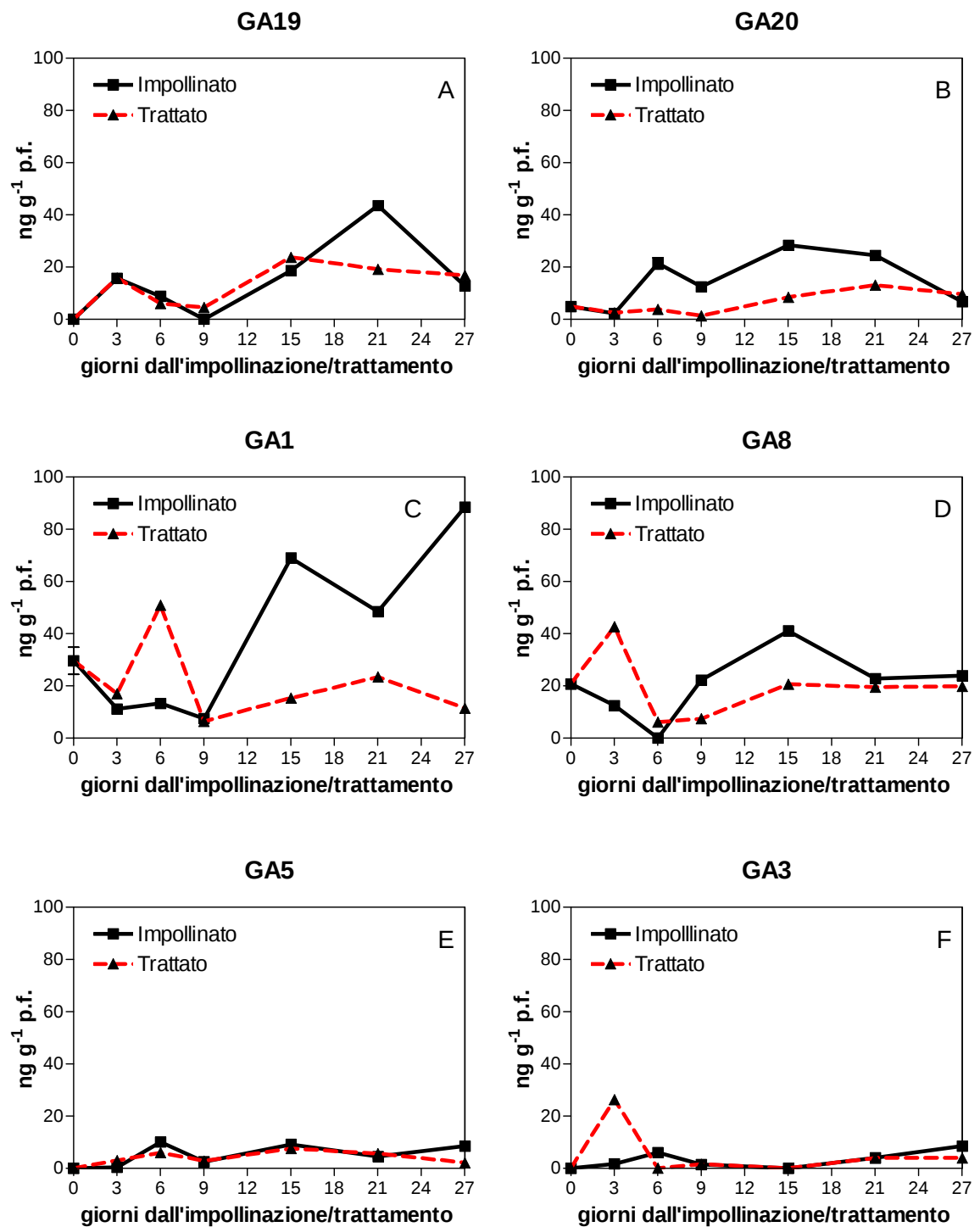


Fig.3 Dinamica dei livelli endogeni delle GAs della via metabolica 13-OH precoce durante lo sviluppo del frutto.

Poiché, come riportato in seguito, l'accrescimento risulta sensibilmente differente nei frutti derivati da impollinazione o trattamento, la dinamica delle quantità delle singole GAs durante lo sviluppo dei frutti è descritto anche come contenuto per singolo frutto (ng/frutto) (Fig. 4).

GA_{19} : il contenuto di questa GA è simile per i due tipi di frutti ad eccezione dello stadio 21 DAP/DAT dove si osserva un maggior livello nei frutti impollinati (23.68 ng/frutto) rispetto ai trattati (8.42 ng/frutto).

GA_{20} : il contenuto di questa GA risulta sempre significativamente maggiore nei frutti impollinati tranne nell'ultimo stadio di sviluppo analizzato (27 DAP/DAT).

GA_1 : nella prima fase di sviluppo dei frutti trattati si nota un picco dopo 3 giorni dal trattamento assente nei frutti impollinati. Nello sviluppo successivo del frutto la concentrazione risulta sempre più elevata nei frutti impollinati rispetto ai frutti trattati.

GA_8 : la dinamica dei livelli endogeni segue lo stesso andamento tra le due tesi con un picco dopo 15 giorni.

GA_5 e GA_3 : il contenuto di queste due GAs rimane sempre molto basso durante tutto lo sviluppo del frutto e non presenta differenze significative tra i frutti impollinati e frutti trattati.

3.1.2. Livelli endogeni di IAA

I livelli di IAA nei frutti impollinati e trattati sono riportati in figura 5.

Il livello endogeno di IAA è molto elevato negli ovari prima dell'impollinazione/trattamento (tempo 0) (293.84 ng g⁻¹ p.f.) e decresce drasticamente in entrambe le tesi negli stadi successivi. Tuttavia nei frutti trattati il livello di IAA cala più drasticamente raggiungendo livelli bassissimi già dopo 3 giorni dal trattamento, mentre i frutti impollinati raggiungono lo stesso livello soltanto 9 giorni dopo l'impollinazione. Successivamente la concentrazione di IAA risale nei frutti impollinati mentre rimane sempre molto bassa nei frutti trattati.

Dopo 15 giorni dall'impollinazione/trattamento il livello di IAA è circa 7 volte più elevato nei frutti impollinati (31.03 ng g⁻¹ p.f. nei frutti impollinati, 4.47 ng g⁻¹ p.f. frutti trattati). Dopo 21 giorni dall'impollinazione/trattamento il livello di IAA nei frutti impollinati cala pur rimanendo più elevato di quello dei frutti trattati e come si può notare (Fig. 6A-B) è localizzato soprattutto nei semi.

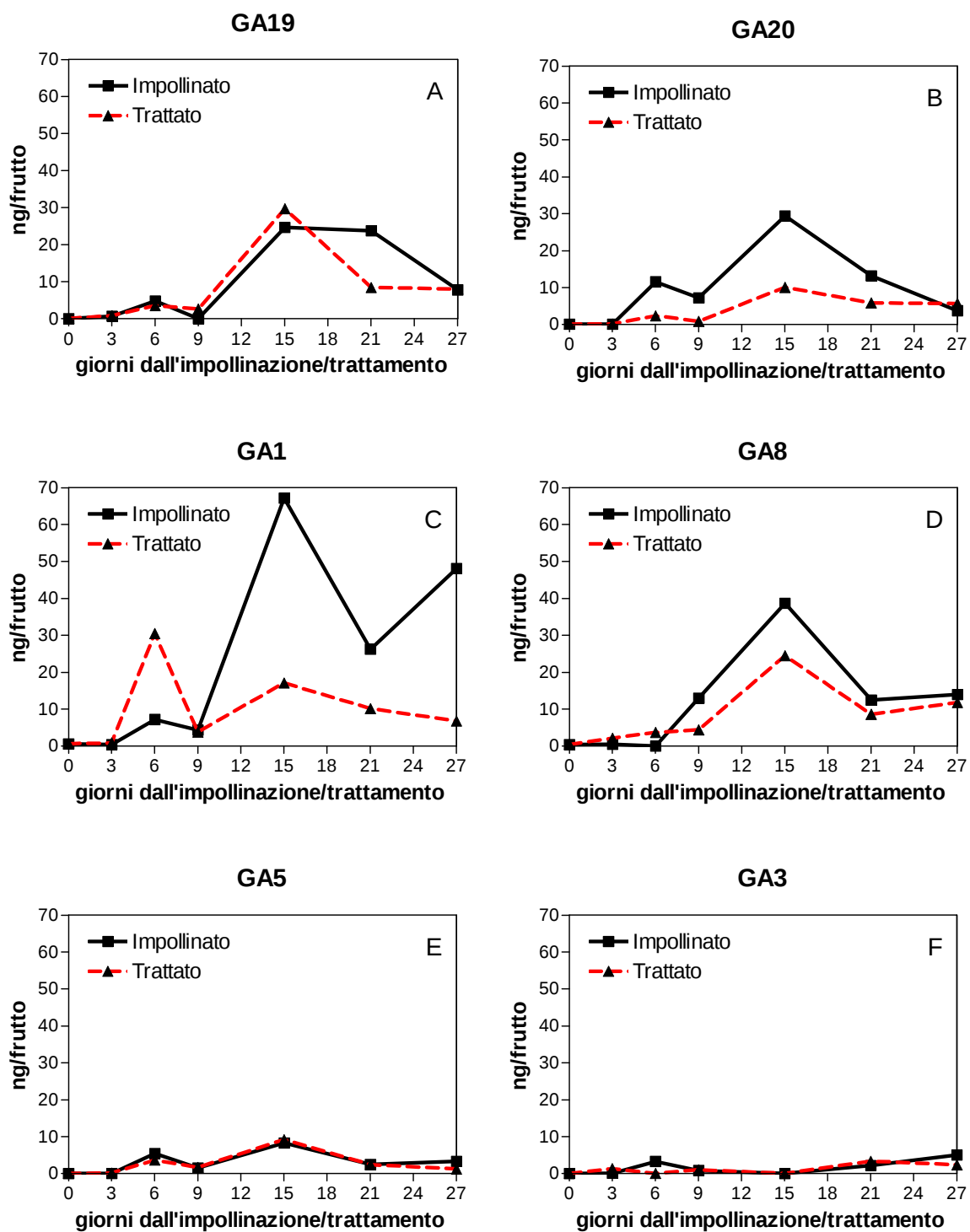


Fig. 4 Dinamica del contenuto per frutto delle GA della via biosintetica 13-OH precoce (ng /frutto)

Infine, 27 giorni dopo impollinazione/trattamento, la concentrazione di IAA nei frutti impollinati è ben 15 volte superiore rispetto ai frutti trattati e i livelli più elevati si riscontrano nei semi e nei tessutioculari (Fig. 6A-B).

I livelli endogeni di IAA espressi come ng/frutto sono riportati in fig.7. il contenuto ormonale risulta sempre maggiore nei frutti impollinati in particolare dopo 15 (20.90 ng/frutto nei frutti impollinati e 4.76 ng/frutto nei frutti trattati) e 27 DAP (39.01 ng/frutto nei frutti impollinati e 2.76 ng/frutto nei frutti trattati).

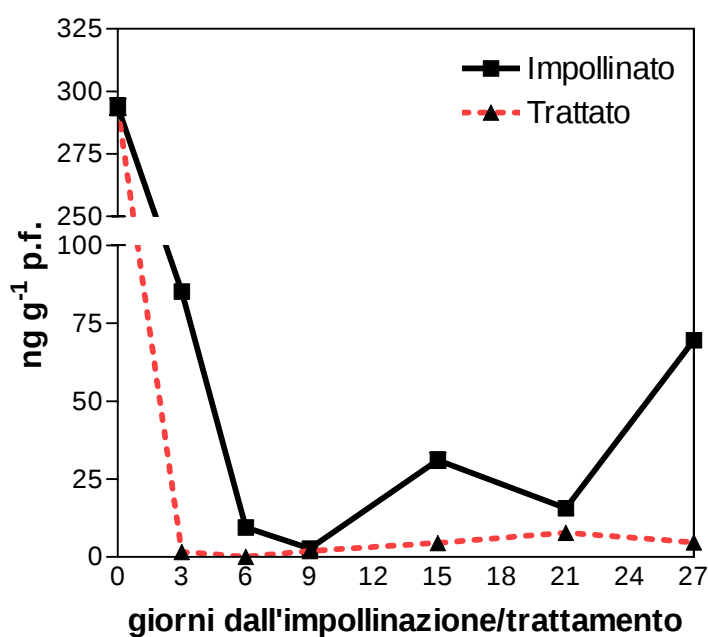


Fig.5 Dinamica del livello endogeno di IAA libero durante lo sviluppo del frutto

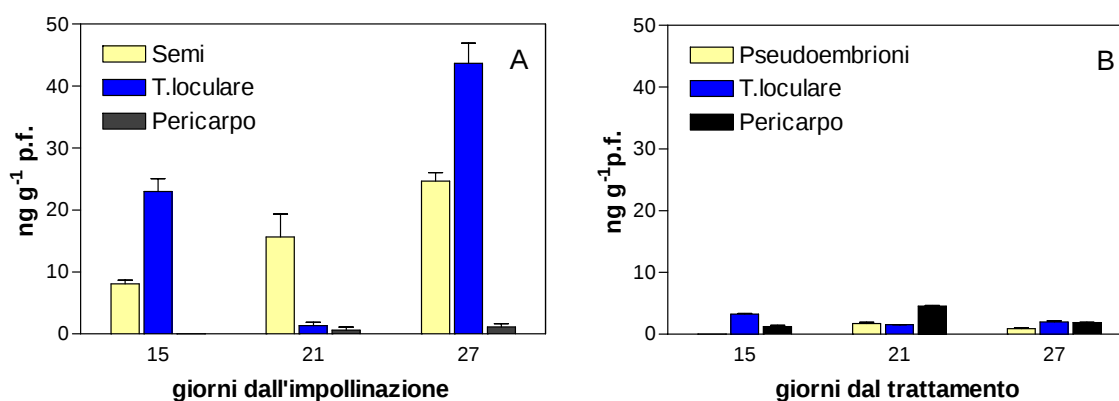


Fig.6 Livelli endogeni di IAA libero nei diversi tessuti del frutto di pomodoro durante le fasi di sviluppo da 15 a 27 DAP/DAT. (A: frutti ottenuti da fiori impollinati, B: frutti ottenuti da fiori trattati con auxina)

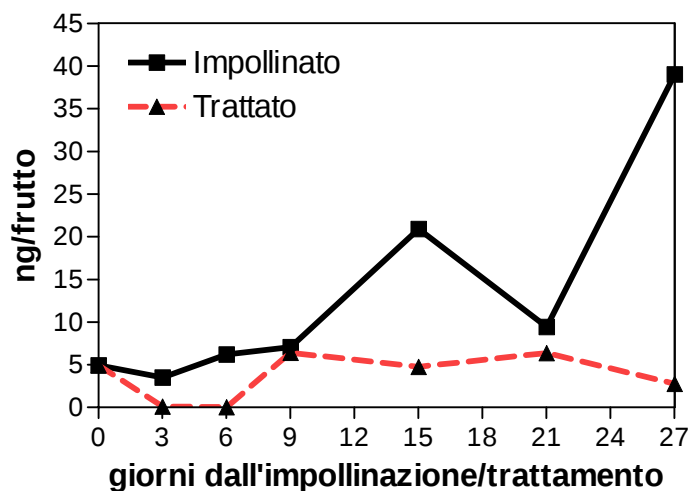


Fig 7 Dinamica del contenuto per frutto di IAA libero (ng /frutto)

3.1.2. Livelli endogeni di citochinine

L'analisi dei livelli endogeni di citochinine è stata focalizzata sui primi 9 giorni DAP/T poiché, in questa fase, la crescita del frutto avviene prevalentemente per divisione cellulare, un processo nel quale questa classe ormonale svolge un ruolo determinante.

In entrambi i frutti (impollinati e trattati) sono state identificate le seguenti citochinine: zeatina, diidrozeatina, zeatina riboside, isopenteniladenina e isopenteniladenosina. Non è stata rilevata la presenza della diidrozeatina riboside.

In figura 8 sono riportati i livelli di citochinine negli ovari e nei frutti durante la prima fase di sviluppo (0-9 DAP/DAT).

Negli ovari prima dell'impollinazione/trattamento le forme di citochinine più abbondanti sono la zeatina ($114.63 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$) e la diidrozeatina ($48.34 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$).

Durante tutta la prima fase di sviluppo del frutto, le forme di CK più abbondanti sono le basi libere sia nei frutti impollinati sia in quelli trattati.

Il livello più alto di CK si osserva per entrambe le tesi 3 giorni dopo l'impollinazione/trattamento. A questo stadio i frutti derivanti dall'impollinazione presentano livelli nettamente più alti di Z, DHZ e iP ($281.33 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$, $150.23 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$, $73.27 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$) rispetto ai frutti trattati ($148.94 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$, $45.23 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$, $7.23 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$). A 6 giorni dall'impollinazione/trattamento il livello complessivo delle CK si abbassa sensibilmente senza marcate differenze tra i due tipi di frutti.

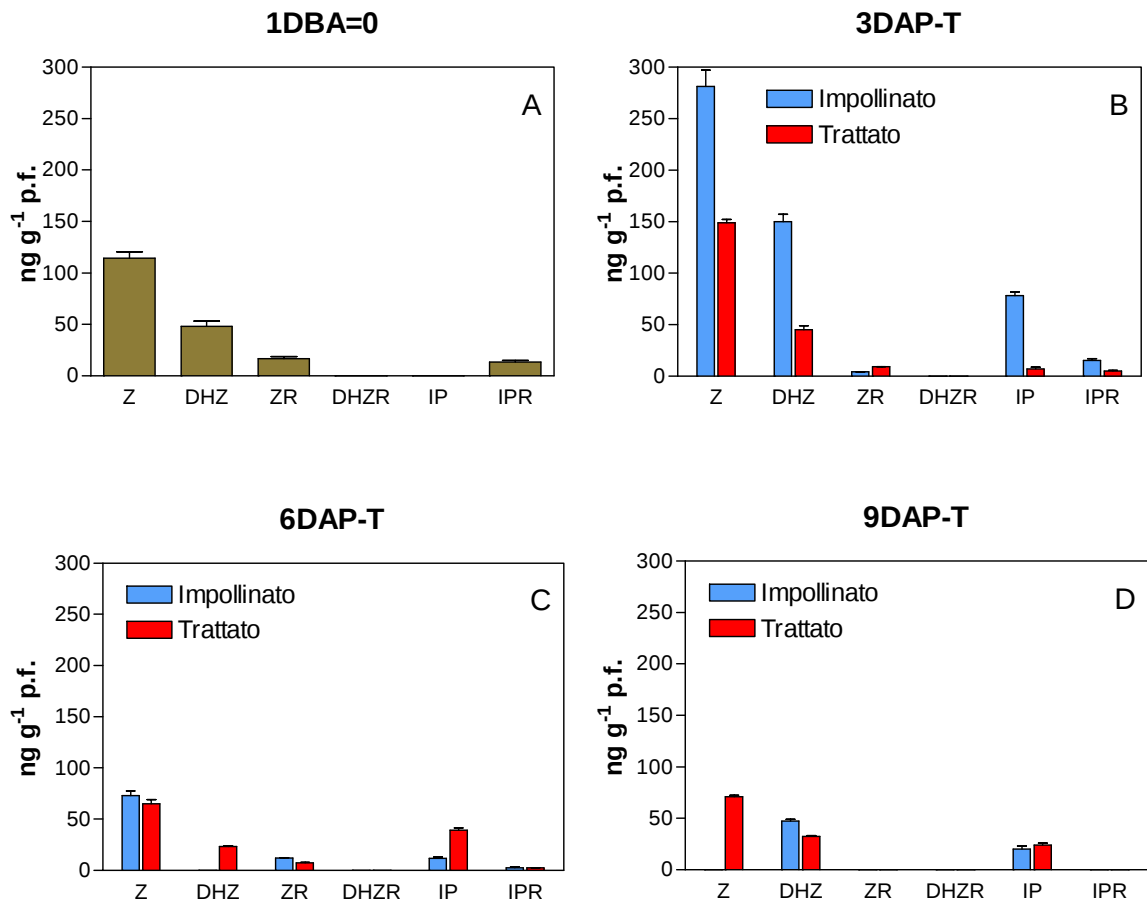


Fig. 8 Livelli endogeni delle CK durante lo sviluppo di frutti impollinati o trattati con auxina (DAP: giorni dopo l'impollinazione; DAT: giorni dopo il trattamento con auxina)

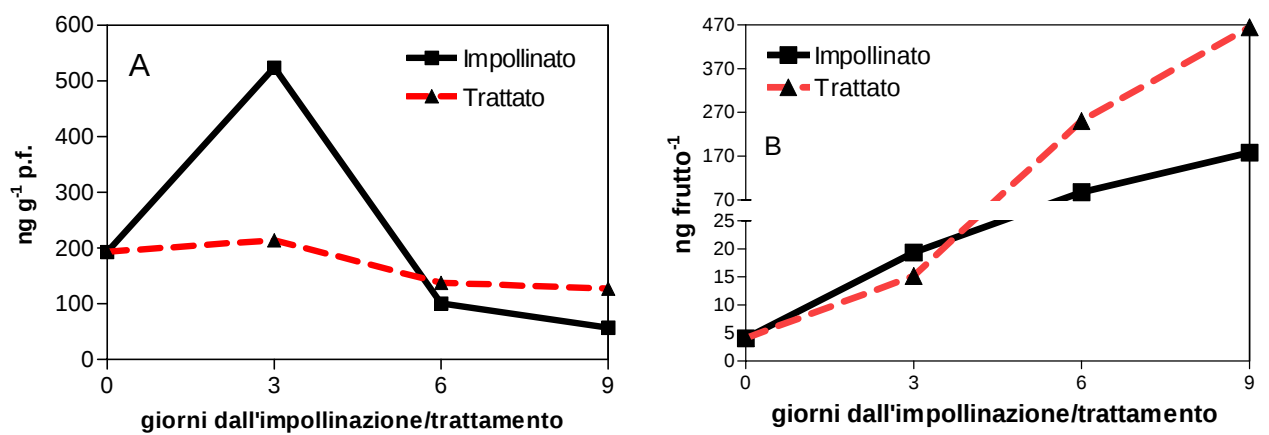


Fig 9 Livello endogeno totale (A) e contenuto totale per frutto di CK (B)

Considerando il livello complessivo delle diverse forme di CK il picco dopo 3 giorni è ben evidente, soprattutto, nei frutti impollinati (fig. 9A).

Esprimendo, invece, il contenuto di CK per frutto risultano valori più elevati nei frutti impollinati nei primi 3 giorni dall'impollinazione/trattamento, mentre nelle fasi successive il contenuto dei frutti trattati diventa progressivamente maggiore (fig. 9B).

3.1.3. Produzione d'etilene

La produzione d'etilene negli ovari e nei frutti è riportato in figura 10.

Negli ovari prima dell'impollinazione/trattamento i livelli d'etilene sono molto elevati ($435.82 \text{ nl g}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Nei frutti in sviluppo, il livello d'etilene diminuisce poi rapidamente sia nei frutti impollinati sia nei frutti trattati raggiungendo livelli molto bassi a 6DAT ($13.43 \text{ nl g}^{-1}\text{h}^{-1}$ frutti trattati) e a 9DAP ($22.99 \text{ nl g}^{-1}\text{h}^{-1}$ frutti impollinati).

Negli stadi successivi i livelli d'etilene rimangono molto bassi in entrambi i frutti fino a 33 DAP/DAT. Dopo 41 giorni dall'impollinazione/trattamento si nota invece un picco in entrambe le tesi, significativamente maggiore nei frutti trattati, in corrispondenza del picco climaterico.

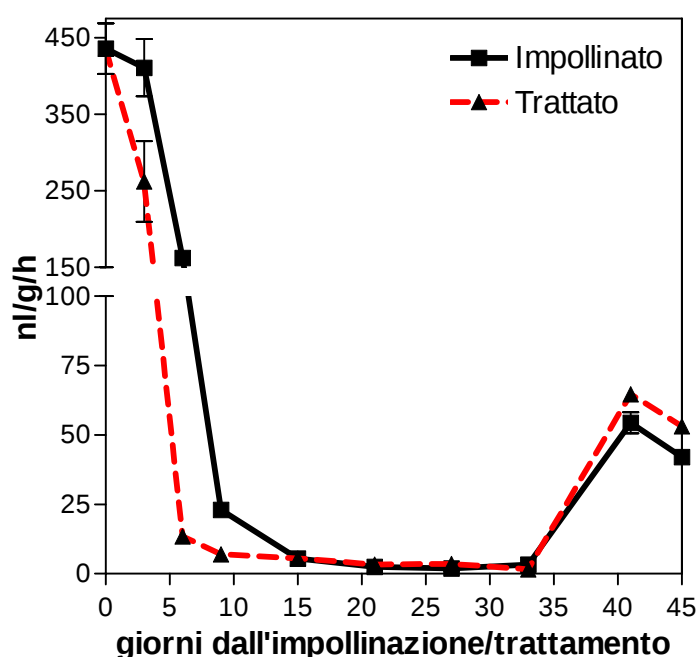


Fig. 10 Produzione d'etilene nei frutti dopo l'impollinazione o trattamento con auxina

3.2. Espressione dei geni del metabolismo delle GAs

E' stata determinata l'espressione dei seguenti geni del metabolismo delle GAs: *SlGA20ox-1*, *SlGA20ox-2*, *SlGA20ox-3*, *SlGA3ox-1* e *SlGA3ox-2*.

Sono stati analizzati gli ovari prima dell'impollinazione/trattamento e i frutti a 3, 6, 9 DAP/DAT. Nei frutti si è proceduto all'analisi dell'espressione genica separatamente nel pericarpo e nel tessuto locale.

SlGA20ox (catalizza la conversione da GA_{53} a GA_{20}). I livelli d'espressione di *SlGA20ox-1*, *SlGA20ox-2*, *SlGA20ox-3* sono riportati rispettivamente in figura 11.

L'espressione dei geni della *GA20ox* è molto più elevata nel tessuto locale rispetto al pericarpo. In questo tessuto, infatti, tutti e tre i geni sono espressi a livelli molto bassi e si osserva soltanto un leggero incremento d'espressione dei geni *GA20ox-1* e *GA20ox-2* con lo sviluppo del frutto mentre al contrario, l'espressione della *GA20ox-3* mostra un leggero diminuzione.

Nel tessuto locale i geni della *GA20ox* sono espressi a livello molto bassi negli ovai prima dell'impollinazione/trattamento con auxina. Successivamente, mentre l'espressione di *GA20ox-2* rimane molto bassa, quella di *GA20ox-1* e *GA20ox-3* aumenta progressivamente con lo sviluppo dei frutti (da 3 a 9 DAP/DAT).

Entrambi i geni sono espressi ad un livello nettamente più elevato nei tessuti locali dei frutti trattati rispetto ai tessuti locali dei frutti impollinati..

Per quanto riguarda il gene *GA20ox-1* la sua espressione nei frutti trattati risulta anticipata rispetto ai frutti impollinati essendo già osservabile dopo 3 DAT. A 6 e 9 DAP/DAT l'espressione della *GA20ox-1* è tre volte superiore nei frutti trattati rispetto ai frutti impollinati

Anche il gene *GA20ox-3* è espresso ad un livello basso nel tessuto locale dell'ovario e la sua espressione aumenta gradualmente dallo stadio 3 allo stadio 9. Anche per questo gene l'espressione nei frutti trattati risulta anticipata rispetto ai frutti impollinati poiché è misurabile a 3 DAT e il gene risulta espresso ad un livello superiore nel trattato rispetto all'impollinato.

Il livello d'espressione dei geni *GA3ox-1-2* è riportato in figura 12. *SlGA20ox* (catalizza la conversione da GA_{20} a GA_1)

Entrambi i geni di *GA3ox* presentano un basso livello d'espressione sia nel pericarpo sia nel tessuto locale. Dei due geni l'unico espresso ad un livello apprezzabile appare il gene della *GA3ox-1*. Nel tessuto locale degli ovai

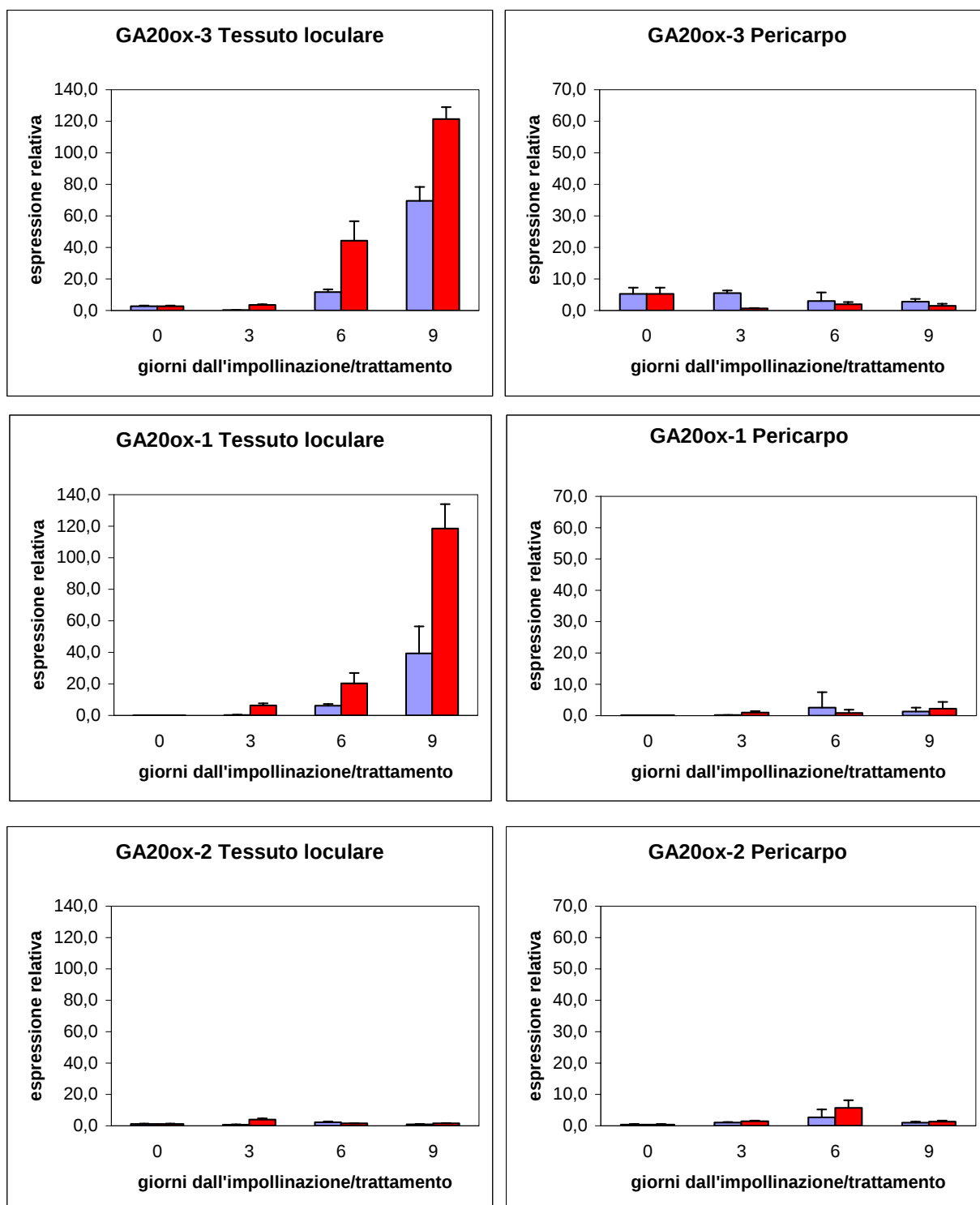


Fig. 11 Livelli d'espressione relativi dei geni *SIGA20ox-1*, *SIGA20ox-2* e *SIGA20ox3* (celeste: impollinato; rosso: trattato con auxina)

l'espressione del gene tende a diminuire più drasticamente dopo l'impollinazione/trattamento nei frutti impollinati. Anche nel pericarpo l'espressione diminuisce dopo l'impollinazione/trattamento ma il calo appare ritardato nei frutti trattati rispetto a quelli impollinati.

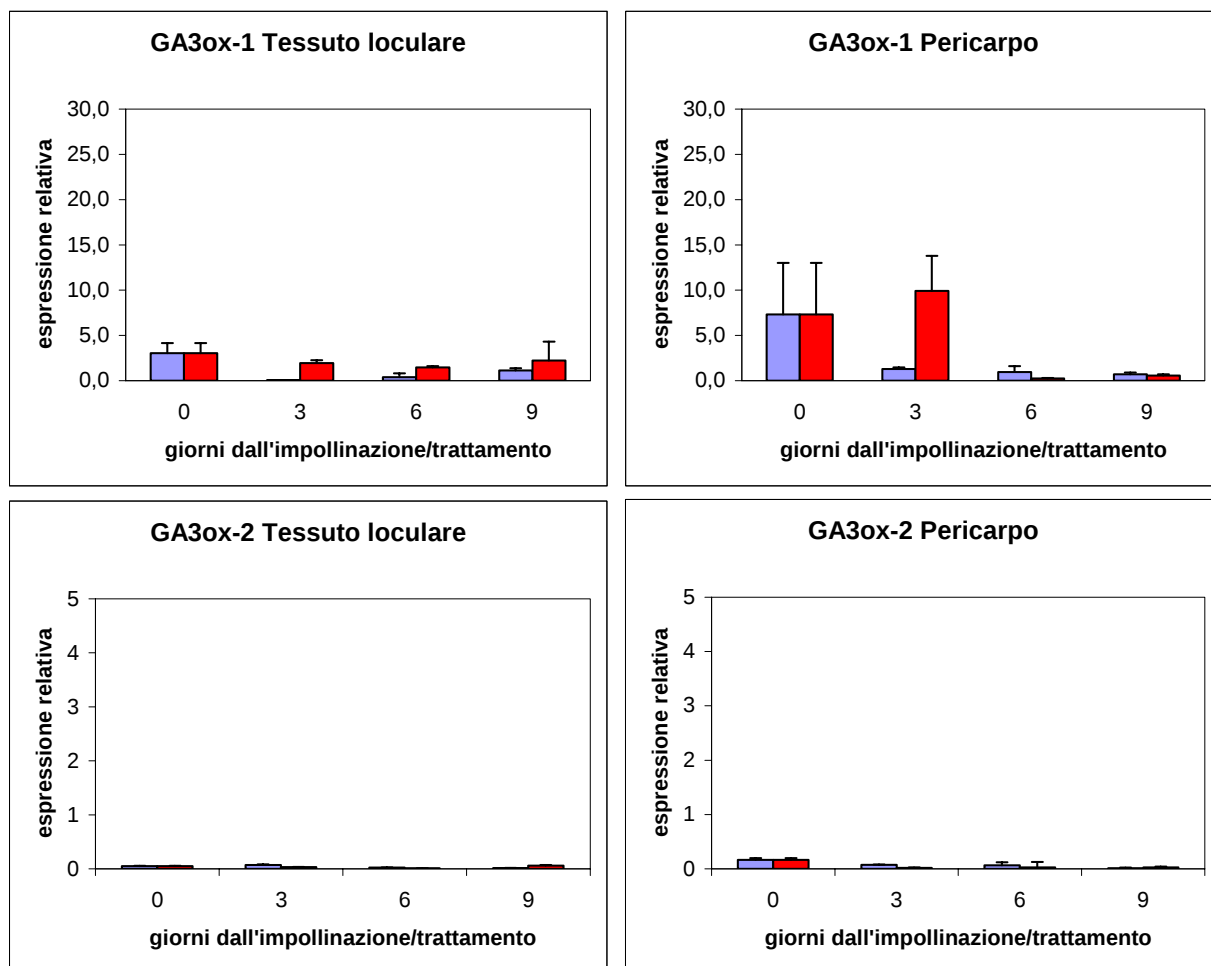


Fig. 12 Livelli d'espressione relativi dei geni *SlGA3ox1*, 2 (rosso: trattato con auxina; celeste: impollinato)

3.3. Parametri qualitativi dei frutti

In figura 13 sono riportati i dati relativi all'accrescimento del frutto, dall'impollinazione/trattamento fino alla maturazione

Come si può osservare nella figura il peso dei frutti trattati con auxina risulta costantemente maggiore rispetto a quelli dei frutti impollinati. Allo stadio finale di

maturazione il peso dei frutti trattati risulta 435.8g mentre quello dei frutti impollinati 299.5g.

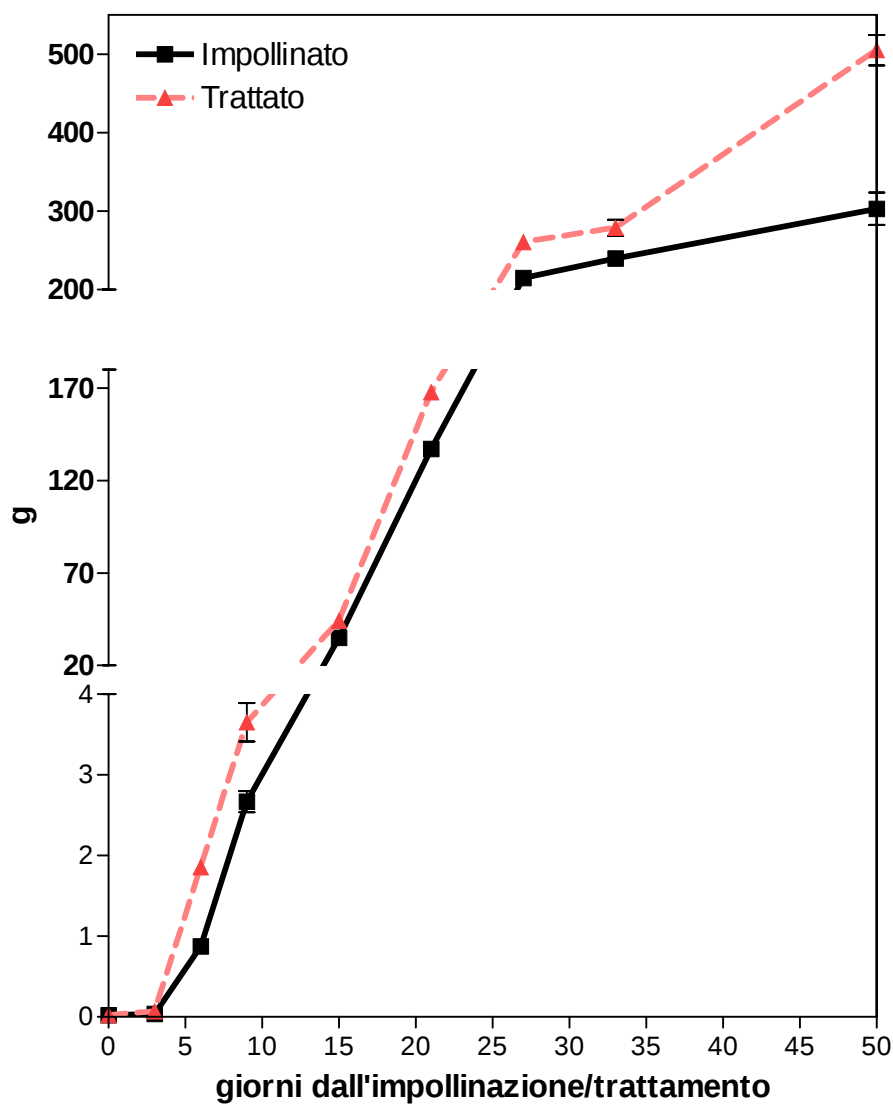


Fig. 13 Peso dei frutti durante lo sviluppo

I risultati dei parametri qualitativi analizzati sono riportati in figura 14.

La consistenza della polpa è stata misurata mediante il penetrometro in due punti del frutto: porzione calicina e porzione mediana. In entrambe le porzioni si registra un valore maggiore nei frutti impollinati e si sono osservate differenze statisticamente

significative per la porzione mediana (1.506 kg/cm² frutti impollinati, 1.287 Kg/cm² frutti trattati).

I frutti impollinati hanno una maggiore concentrazione d'acido ascorbico totale e ridotto (Fig.12G) che è la forma prevalente (ASC ridotto 20.92 mg 100g⁻¹ p.f. nei frutti impollinati, ASC ridotto 19.17 mg 100g⁻¹ p.f. nei frutti trattati con auxina), mentre nei frutti trattati la concentrazione di trans-licopene (Fig.12D), cis-licopene (Fig.12E), il β -carotene (Fig. 12F) e l'acidità titolabile (Fig. 12C) risultano leggermente più elevate.

I parametri qualitativi dei frutti sono stati misurati anche alcuni giorni dopo la raccolta. In figura 15 sono riportati i dati relativi ai parametri qualitativi quantificati nei frutti tenuti 4 giorni a temperatura ambiente.

Si riscontra nei frutti trattati una maggiore acidità titolabile e un valore più elevato di solidi solubili mentre le concentrazioni di ascorbato, delle due forme di licopene e di β -carotene sono più elevate nei frutti impollinati. Nei frutti trattati si riscontra una diminuzione nel contenuto di entrambe le forme di licopene e β -carotene di circa il 13% rispetto al tempo zero mentre nei frutti impollinati le concentrazioni rimangono circa uguali. Nonostante questa diminuzione le differenze fra trattato e impollinato non sono statisticamente significative.

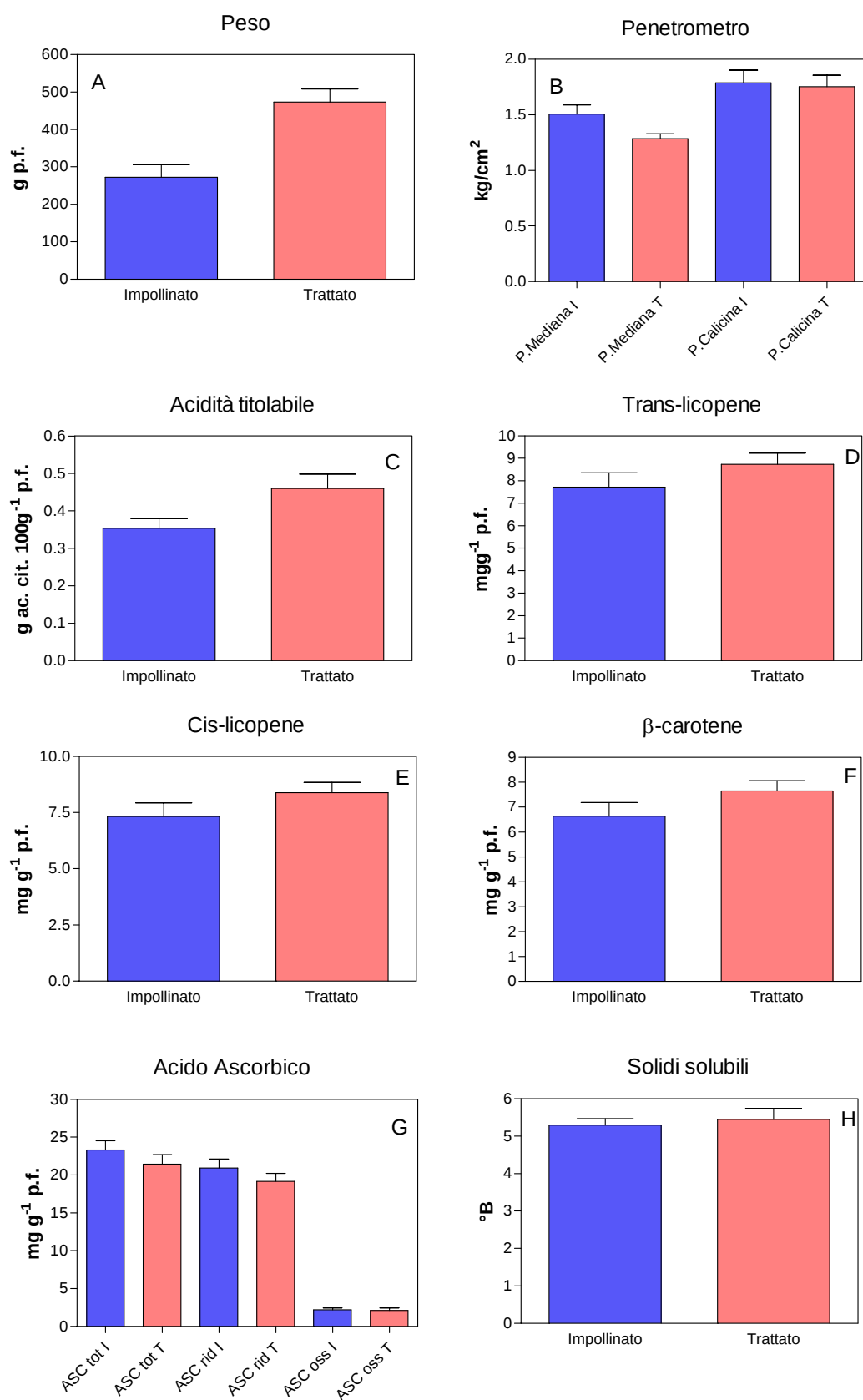


Fig.14 Parametri qualitativi dei frutti ottenuti tramite impollinazione o trattamento con auxina

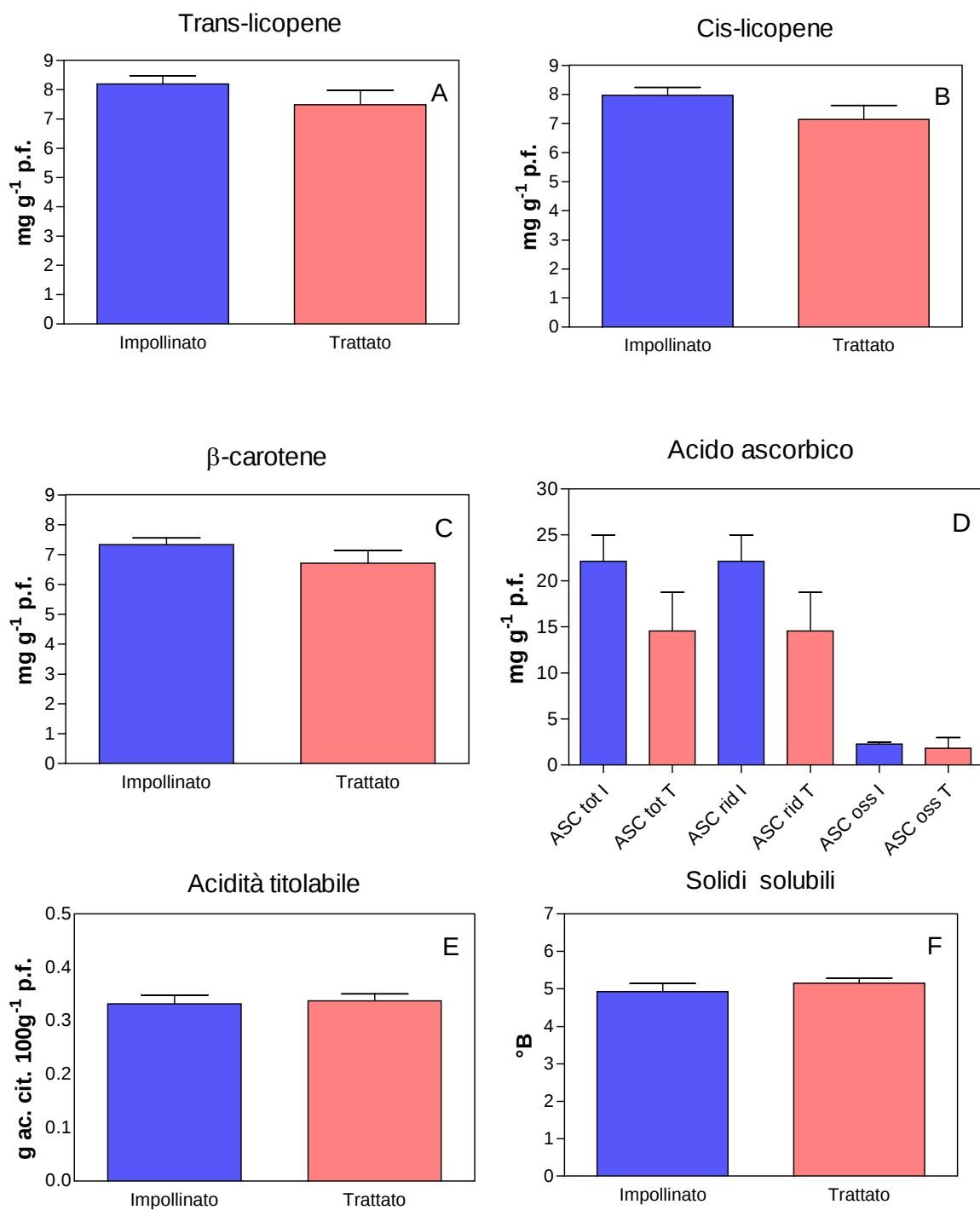


Fig. 15 Parametri qualitativi dei frutti ottenuti con l'impollinazione o il trattamento con auxina quattro giorni dopo la raccolta

4. DISCUSSIONE

Lo sviluppo del frutto e del seme seguono la fecondazione e sono processi fortemente coordinati tra di loro, soggetti a controllo ormonale. Si ritiene generalmente che la senescenza degli ovai non impollinati sia causata da ridotti livelli ormonali. La presenza dei semi è considerata essenziale per lo sviluppo del frutto poiché ritenuti la sede della sintesi ormonale. Nei frutti immaturi di pomodoro sono stati determinati elevati livelli di GAs (Koornneef et al., 1990) e studi con mutanti GA-deficienti suggeriscono che le GAs prodotte dal seme promuovano attivamente lo sviluppo del frutto (Groot et al., 1987).

Lo sviluppo partenocarpico dei frutti, sia genetico sia indotto con trattamenti ormonali dimostra, tuttavia, che lo sviluppo del frutto può essere dissociato dalla presenza dei semi. Gli ormoni più efficaci nell'induzione dello sviluppo partenocarpico degli ovai sono le auxine, le GAs e le citochinine (Schwabe e Mills, 1981) e si assume generalmente che l'applicazione esogena di ormoni surrogati la carenza di ormoni endogeni.

In effetti i frutti partenocarpici naturali contengono spesso livelli ormonali (soprattutto auxine e GAs) più elevati dei frutti derivanti da impollinazione (George et al, 1884; Talon et al, 1990, 1992).

L'origine degli ormoni del frutto da tessuti diversi dai semi è stata dimostrata direttamente da studi su piante di melanzana e pomodoro transgeniche, che sovrapproducono auxine (Rotino et al, 1997).

Una conferma significativa al ruolo delle GAs nel controllo dello sviluppo del frutto e all'origine biosintetica di questi ormoni da tessuti diversi dal seme, deriva da studi condotti sul mutante biosintetico *ga-1* di *Arabidopsis* (Barendse et al., 1986). In questo mutante, pressoché privo di GAs lo sviluppo del frutto dipende, infatti, dalla somministrazione di GAs esogene, dopo l'impollinazione. Incroci reciproci tra mutante e *wt* hanno inoltre dimostrato che, per lo sviluppo della siliqua, sono essenziali le GAs prodotte dalle cellule materne e non soltanto dai semi.

Nonostante le molte evidenze che sostengono fortemente il coinvolgimento degli ormoni nello sviluppo partenocarpico del frutto (induzione di sviluppo partenocarpico con trattamenti ormonali e elevati livelli ormonali nei frutti partenocarpici), gli eventi molecolari che regolano l'allegagione e le fasi successive della crescita del frutto e il sistema endogeno di regolazione ormonale di questi processi, sono ancora poco conosciuti.

L'obiettivo della ricerca condotta durante i tre anni del Corso di Dottorato è stato quello di studiare il ruolo svolto dalle principali classi ormonali nello sviluppo del frutto di pomodoro.

L'approccio sperimentale seguito prevedeva di confrontare frutti ottenuti mediante impollinazione manuale con frutti partenocarpici indotti con trattamento auxinico. Nonostante l'uso dei fitoregolatori sia una pratica molto diffusa durante la coltivazione autunno-invernale del pomodoro per ottenere l'allegagione e lo sviluppo del frutto, ad oggi non si conoscono gli effetti del trattamento auxinico sul sistema di regolazione ormonale durante lo sviluppo del frutto.

Nella fase iniziale di questo studio sono stati quantificati i livelli endogeni di GAs, IAA, CK e etilene e successivamente è stata analizzata l'espressione genica di alcuni geni chiave della biosintesi delle GAs.

I livelli endogeni degli ormoni sono stati analizzati nel frutto intero a 0, 3, 6, 9 giorni dall'impollinazione/trattamento mentre negli stadi successivi 15, 21, 27 DAP/T l'analisi delle GAs e IAA è stata effettuata nei principali tessuti del frutto: seme/pseudoembrioni, tessuto loculare e pericarpo. Quest'approccio dovrebbe fornire maggiori informazioni sulle interazioni ormonali tra i singoli tessuti del frutto e sulla regolazione nel suo sviluppo.

Uno studio recente in pomodoro ha analizzato l'espressione di 21 geni in diversi tessuti del frutto (esocarpo, mesocarpo+endocarpo, tessuti loculari, semi e columella) dopo 22 giorni dall'antesi. Nelle conclusioni gli autori (Lemaire-Chamley et al., 2005) suggeriscono che per comprendere i meccanismi che controllano lo sviluppo del frutto di pomodoro gli studi dovrebbero essere localizzati sui singoli tessuti che compongono quest'organo.

Durante lo sviluppo del frutto di pomodoro impollinato e trattato con auxina sono stati determinati i livelli endogeni delle GAs della via 13-OH precoce: GA_{19} e GA_{20} i precursori delle GAs biologicamente attive, GA_1 , GA_5 , GA_3 e la GA biologicamente inattiva prodotta dal catabolismo di GA_1 , la GA_8 .

Dal confronto tra i livelli endogeni delle GAs nei due tipi di frutti possiamo notare che nei primi giorni dall'impollinazione/trattamento le concentrazioni di GA_1 , GA_3 (solo dopo 3DAT) e GA_8 sono più elevate nei frutti partenocarpici. Al contrario nei successivi stadi di sviluppo le concentrazioni di GA_1 e GA_8 sono costantemente più elevate nei frutti impollinati. Dalle analisi effettuate sui singoli tessuti del frutto a

diversi stadi di sviluppo i livelli più elevati di GAs, in particolare GA₁, si osservano nei semi e nel tessuto locale.

Koshioka et al. (1994) hanno analizzato il contenuto di GAs in frutti di pomodoro partenocarpici ottenuti con trattamento a base di 4-CPA e in frutti impollinati. Considerando i livelli endogeni di GA₁₉, GA₂₀ e GA₁ nei due tipi di frutti questi autori traggono conclusioni parzialmente contrastanti con il nostro lavoro suggerendo che l'impollinazione stimola la via biosintetica delle GAs nei primi stadi di sviluppo dell'ovario in misura maggiore rispetto al trattamento auxinico. Al contrario, negli stadi di sviluppo successivi la GA₁, biologicamente attiva, raggiunge livelli endogeni più elevati nei frutti trattati suggerendo: 1) che il passaggio limitante nella sintesi di GAs sia rappresentato dalla conversione di GA₂₀ a GA₁ catalizzata dalla GA3 ossidasi, 2) che il trattamento auxinico stimoli l'attività di quest'enzima. Contrariamente a quanto riportato da Koshioka et al. (1994) i quali hanno rilevato assenza o livelli molto bassi di GAs negli ovari di pomodoro prima e immediatamente dopo l'antesi i dati da noi qui riportati indicano la presenza di livelli apprezzabili di GAs, in particolare GA₁, negli ovari un giorno prima dell'antesi.

L'analisi delle GAs endogene in mutanti partenocarpici di pomodoro *pat*, *pat-2* e *pat-3/4* evidenzia un quadro ormonale coerente con i dati da noi riportati. Infatti in tutti i mutanti, pur con alcune differenze metaboliche la via biosintetica delle GAs risulta esaltata rispetto agli ovari impollinati. In *pat* e *pat-2* il maggior livello di GA₁ è stato attribuito principalmente a una maggiore attivazione della GA20ox mentre in *pat-3/4* l'analisi dei livelli endogeni sembra indurre una maggiore attivazione di tutta la via biosintetica (Fos et al., 2000; 2001, Olimpieri et al., 2007 in stampa).

Trattamenti con inibitori della via di biosintesi delle GAs (paclobutrazolo) sia in ovari di mutanti partenocarpici *pat*, *pat-2* e *pat-3/4* sia in ovari impollinati hanno confermato la stretta correlazione tra attivazione della via biosintetica delle GAs e sviluppo del frutto (Fos et al., 2000; 2001, Olimpieri et al., 2007 in stampa).

L'insieme dei dati relativi ai livelli endogeni di GAs indicano che lo sviluppo partenocarpico è accompagnato da una maggiore attivazione dei livelli di GAs. Tuttavia i dati sui livelli endogeni non permettono di individuare quali passaggi della via biosintetica siano regolati nello sviluppo partenocarpico.

L'analisi dell'espressione dei geni (GA20ox e GA3ox) che controllano l'ultima fase del metabolismo gibberellinico e regolano il livello delle GAs biologicamente attive ci fornisce indicazioni più significative a questo proposito.

Dei tre geni della GA20ox nel frutto di pomodoro risultano espressi principalmente la *GA20ox-1* e *GA20ox-3* confermando precedenti osservazioni di Rebers et al. (1999). Per entrambi i geni il livello di espressione relativa è significativamente maggiore nei frutti trattati rispetto ai frutti impollinati e l'espressione risulta prevalentemente a carico del tessuto locale mantenendosi sempre bassa nel pericarpo. Dati recenti in pomodoro confermano che l'espressione della *GA20ox-1* è preferibilmente espressa nel tessuto locale (Lemaire-Chamley et al., 2005).

Entrambi i geni della GA3ox (*GA3ox-1* e 2) sono invece espressi a basso livello sia nei frutti impollinati sia in quelli trattati. I risultati dell'analisi dell'espressione genica indicano quindi che nello sviluppo del frutto di pomodoro i passaggi limitanti della sintesi di GAs sono quelli catalizzati dalla GA20ox mentre l'espressione della GA3ox appare espressa costitutivamente a basso livello. Inoltre il maggior livello endogeno di GAs biologicamente attive osservate nei frutti trattati con auxina appare correlato con un aumento dell'espressione dei geni della GA20ox.

Queste conclusioni contraddicono l'ipotesi di Koshioka et al. (1994) e Rebers et al. (1999) i quali suggeriscono un controllo da parte delle auxine esogene sulla GA3ox e concordano invece con l'espressione genica osservata in *pat* (Olimpieri et al., 2007 in stampa) e con quanto ipotizzato per il *pat-2* (Fos et al., 2000).

Considerando che, i livelli endogeni di GAs e l'espressione dei geni per l'espressione di questa classe ormonale sono più elevate nei semi e tessuti locali può essere avanzata l'ipotesi che le GAs prodotte in questi tessuti siano esportate nel pericarpo dove contribuiscono all'espansione cellulare e quindi alla crescita di questo tessuto come suggerito anche da Garcia-Martinez e Hedden (1997). Questa ipotesi è sostenuta anche dai dati riportati da Bonher et al. (1988) e Kojima et al. (2003).

Nei frutti partenocarpici genetici e nei frutti indotti con trattamento auxinico, al posto dei semi si sviluppano strutture, denominate pseudoembrioni o pseudosemi che si originano dagli strati più interni dei tegumenti ovarici (Asahira et al., 1967). Allo sviluppo di questi pseudoembrioni è stato attribuito, un ruolo importante nell'allegagione e nello sviluppo del frutto (Kataoka et al., 2003) suggerendo che queste strutture possano agire come sostituti dei semi. Nel pomodoro partenocarpico *pat-2* lo sviluppo degli pseudoembrioni risulta correlato strettamente con la crescita del frutto e con i livelli endogeni di GAs. L'applicazione di uniconazolo, un inibitore della biosintesi delle GAs, all'antesi o alcuni giorni dopo inibisce fortemente l'allegagione, ristabilita invece dall'applicazione di GA₃ (Kataoka et al., 2004). In frutti partenocarpici

di anguria, ottenuti con trattamento con CPPU, è stata rilevata l'espressione del gene della GA20ox nei tegumenti ovarici (Kang et al., 1999). Questo dato mette in evidenza la relazione tra la formazione degli pseudoembrioni e lo sviluppo partenocarpico del frutto e conferma una precedente ipotesi: l'importanza delle GAs nello sviluppo partenocarpico del frutto sembra sia limitata ai primi stadi di sviluppo (Groot et al. 1987). Mentre l'uniconazolo blocca l'allegagione e sviluppo del frutto se applicato immediatamente dopo l'antesi, lo stesso inibitore risulta inefficace se applicato dopo tre settimane dall'antesi (Kataoka et al., 2004).

Il ruolo delle GAs nella prima fase di sviluppo del frutto di pomodoro potrebbe essere correlato all'attività delle proteine chinasi ciclina-dipendenti coinvolte nella regolazione della divisione cellulare negli eucarioti (Forsburg e Nurse, 1991; Norbury e Nurse, 1992). E' stato osservato che l'espressione di tre cicline D3 aumenta negli ovari di pomodoro dopo l'impollinazione con un picco dopo tre giorni dall'antesi (Kvarnheden et al., 2000). L'attività di questa ciclina è stata correlata con la regolazione ormonale, in particolare GAs e CK, della divisione cellulare durante la crescita del frutto.

Sulla base dei dati qui presentati e delle informazioni derivanti dai mutanti partenocarpici, l'azione delle GAs sembra svolgersi principalmente nella prima fase di sviluppo del frutto caratterizzata dalla divisione cellulare. L'ipotesi di una correlazione tra ciclina, divisione cellulare e GAs sarà approfondita nello sviluppo di questo lavoro.

Prima dell'antesi il livello endogeno di IAA negli ovari è elevato. Dopo l'impollinazione/trattamento con auxina il livello di IAA diminuisce rapidamente; questa diminuzione è significativamente più rapida nei frutti trattati. Successivamente il livello di IAA rimane sempre basso nei frutti trattati mentre nei frutti impollinati l'IAA aumenta di nuovo negli stadi successivi. Mapelli et al. (1978) analizzando il livello di IAA in frutti di pomodoro con metodiche basate su biosaggio ha osservato due picchi di auxina rispettivamente a 10 e 30 giorni dall'antesi. Tuttavia l'analisi dell'IAA endogeno, utilizzando GC-MS, ha evidenziato un rapido calo del livello ormonale nei giorni successivi alla fecondazione (4-5 giorni) seguito da un aumento più o meno progressivo nella fase di sviluppo successivo (Bonher e Bangerth, 1988). Il rapido calo di IAA successivo all'impollinazione/trattamento dovrebbe essere associato con la transizione della fase di divisione cellulare alla fase di espansione cellulare, che si verifica da 7 a 14 giorni dall'antesi (Cong et al., 2002).

L'analisi dei livelli endogeni di IAA nelle diverse parti del frutto dopo i primi 10 giorni di sviluppo mostra che l'ormone è principalmente localizzato nei semi e nel tessuto loculare dei frutti impollinati mentre il livello di IAA nel pericarpo rimane sempre molto basso. Questi risultati confermano osservazioni e riportate da Bonher e Bangerth (1988). Varga e Bruinsma (1976) ipotizzano che l'IAA prodotto nei semi aumenti l'attività di sink dei frutti e quindi che il contenuto di IAA sia correlato con le dimensioni finali del frutto. I dati da noi ottenuti negano una correlazione diretta tra IAA prodotto nei semi e dimensioni del frutto: infatti i frutti trattati hanno una dimensione finale assai maggiore rispetto ai frutti impollinati nonostante nei primi non si osservi produzione di IAA da parte degli pseudoembrioni e tessuto loculare come, al contrario, si verifica per i semi o tessutioculari dei frutti impollinati. Questa conclusione basata sull'analisi diretta dei livelli endogeni di IAA nelle diverse parti del frutto apporta evidenze sperimentali ad una analoga conclusione di Bonher e Bangerth (1988) basata soltanto sulla relazione tra numero di semi e dimensioni dei frutti.

Analizzando l'andamento dinamico dei livelli di IAA durante lo sviluppo del frutto si può osservare che nei frutti impollinati i picchi di IAA dopo 15 e 27 DAP nel tessuto loculare e nei semi coincidono con i picchi di GA_1 negli stessi tessuti.

Il coinvolgimento delle auxine nello sviluppo precoce dei frutti di pomodoro emerge anche da diverse indagini recenti aventi come oggetto la regolazione di geni auxino-specifici (Catala et al., 2000), lo studio di mutanti diageotropici (Balbi e Lomax, 2003), e di linee transgeniche alterate per la sintesi o la trasduzione del segnale (Pandolfini et al., 2002; Carmi et al., 2003). I risultati di questi studi indicano che l'IAA sembra necessario per lo sviluppo e per l'espansione del tessuto loculare ed è stato ipotizzato che l'ormone prodotto nella parte centrale del frutto (semi e/o loculi) possa attivare e coordinare l'espressione di proteine coinvolte nell'espansione cellulare (Lemaire-Chamley et al., 2005).

La produzione di etilene in frutti di pomodoro è stata generalmente determinata a partire dallo stadio di frutto verde maturo fino alla completa maturazione (Srivastava e Handa, 2005). La produzione di etilene durante lo sviluppo del frutto di pomodoro mostra un andamento che ricorda strettamente quella già osservato per l'IAA: produzione elevata in ovari non impollinati, un rapido calo nei giorni successivi raggiungendo livelli molto bassi dopo circa una settimana dall'impollinazione/trattamento. Come già si verifica per l'IAA, il calo di produzione di etilene appare molto più repentino nei frutti trattati raggiungendo bassi livelli già dopo 6

giorni rispetto ai 9 giorni dei frutti impollinati. In entrambi i frutti, impollinati e trattati, i livelli di etilene rimangono bassi negli stadi successivi fino allo stadio di maturazione verde del frutto. La dinamica dei livelli endogeni di etilene osservata nelle prime fasi di sviluppo successive all'impollinazione si accorda bene con i dati riportati da Atta-Aly et al. (1999). Sulla base della relazione tra livelli endogeni di ormone, divisione cellulare e dimensioni finali del frutto questi autori suggeriscono che l'etilene regoli il passaggio della fase di divisione a quella di espansione cellulare; secondo questo schema, la divisione cellulare cesserebbe soltanto quando l'etilene scende al suo livello basale, promuovendo il processo di espansione cellulare che diventa dominante. Recentemente, Balbi e Lomax (2003) utilizzando un mutante di pomodoro diageotropico (*dgt*) auxino-resistente suggeriscono una possibile interazione tra auxina e etilene nelle prime fasi di sviluppo del frutto di pomodoro.

Le citochinine nei frutti sono state generalmente localizzate nei semi e correlate alla divisione cellulare dei tessuti circostanti e all'attività di sink (Abdel-Rahman et, 1975; Gillaspay et al, 1993; Srivastava e Handa, 2005).

In questo studio, l'analisi dei livelli endogeni di citochinine è stata focalizzata sui primi 9 giorni DAP/T poiché, in questo fase, la crescita del frutto di pomodoro avviene prevalente per divisione cellulare (Bunger-Kibler e Bangerth, 1982/83; Mapelli et al., 1978), un processo nel quale è stata spesso implicata questa classe ormonale.

Nella prima fase di sviluppo del frutto le citochinine sono costituite essenzialmente da basi libere, mentre le forme ribosilate rappresentano una frazione molto ridotta. Analizzando il contenuto di Z e ZR in frutti di pomodoro ad uno stadio più di sviluppo più avanzato (frutti di 6 e 8 cm di diametro) Kojima et al. (2003) hanno osservato livelli più elevati di ZR localizzati soprattutto nel tessuto locale. Espressione preferenziale del gene della zeatina glucosiltransferasi nei tessuti locali del frutto del pomodoro, possibilmente correlata con la prima fase di crescita del frutto per divisione cellulare, è stata recentemente riportata da Lemaire-Chamley et al. (2005). Un picco nei livelli endogeni di citochinine libere è ben riconoscibile allo stadio 3 DAP/T, seguito da un calo abbastanza consistente. Una dinamica simile è stata osservata, relativamente a Z e ZR, da Bohner e Bangerth (1988) analizzando tramite radioimmunosaggio frutti di *Lycopersicon pimpinellifolium*, e, sulla base di biosaggi, da Mapelli (1981).

Il confronto tra frutti impollinati e frutti trattati evidenzia la presenza di un livello più ridotto di citochine in frutti caratterizzati da sviluppo partenocarpico, nei

quali il picco a 3 DAT appare appena accennato, confermando quanto osservato in termini di attività citochino-simile, analizzando frutti del mutante *pat* e *wt* (Mapelli, 1981). Un livello più basso di citochinine nei frutti partenocarpici è stato riportato anche da Varga e Bruinsma (1974) ma, in questo caso i frutti sono stati analizzati ad uno stadio più tardivo.

Piante di pomodoro trasformate con un costrutto costituito da un promotore ovario-specifico e dal gene *ipt* del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens* mostravano un aumento di citochinine endogene negli ovari (Martineau et al, 1995). Il maggior livello di citochinine è stato correlato con un possibile aumento dell'attività di sink degli ovari benché la dimensione finale del frutto nelle piante trasformate fosse minore del tipo selvatico.

L'insieme delle evidenze sperimentali indica che l'allegagione e lo sviluppo del frutto sono controllate da diverse classi ormonali che regolano questo processo attraverso un sistema di interazioni complesso che prevede sia forme di cross-talking ormonale, con la diretta regolazione della sintesi di un ormone da parte di un altro ormone, come nel caso delle auxine e delle GAs, sia interazioni a livello di sequenza di trasduzione del segnale ormonale. Lo sviluppo partenocarpico del frutto ottenibile con applicazioni ormonali è quindi il risultato di una diversa interazione ormonale rispetto a quella conseguente ad impollinazione e fecondazione, piuttosto che la diretta conseguenza dell'aumentato livello endogeno dell'ormone utilizzato per stimolare lo sviluppo partenocarpico. Frutti di pomodoro ottenuti a seguito di applicazione di auxine hanno un peso finale, alla raccolta commerciale, nettamente superiore a quello dei frutti ottenuti tramite impollinazione. Ciò può essere la conseguenza di un diverso numero iniziale di cellule negli ovari, (Bohner e Bangerth, 1988; Frery et al., 2000) ma anche il risultato di una alterazione dei rapporti, e quindi dell'interazione, dei diversi ormoni coinvolti nel controllo di questo processo. L'azione dei singoli ormoni nella regolazione dello sviluppo del frutto appare diversa e specie-specifica. In *Arabidopsis*, le GAs stimolano la divisione cellulare nel pericarpo mentre le auxine stimolano la fase successiva di espansione cellulare, mentre in pomodoro, l'azione dei due ormoni nelle due fasi di crescita del frutto, appare rovesciata (Vivien-Smith e Koultonow, 1999). In *Pisum*, l'etilene, in condizioni sfavorevoli per lo sviluppo del frutto, agisce come inibitore dell'azione delle GAs (Johnstone et al., 2005), forse attraverso un meccanismo analogo a quello individuato nelle radici di *Arabidopsis*, dove l'ormone inibisce la degradazione delle proteine DELLA, in particolare della proteina RGA, promossa dalle GAs (Achard et al., 2003). In pomodoro l'applicazione precoce di

Ethrel (composto che rilascia etilene) estende la fase di divisione cellulare e aumenta le dimensioni finali del frutto, ritardando la maturazione (Atta-Aly et al., 1999).

Le citochinine e le GAs hanno un'azione opposta nella regolazione di molti processi di sviluppo (Greenboim-Wainberg et al., 2005). I frutti partenocarpici di pomodoro, sia come conseguenza di trattamento ormonale sia per partenocarpia genetica, sono caratterizzati da un livello ridotto di citochinine e da più elevati livelli di GAs che potrebbero influenzare diversamente, rispetto ai frutti impollinati, le due fasi di divisione ed espansione cellulare. Cross-talk tra GAs e citochinine nel controllo dello sviluppo della siliqua, è stato riportato in *Arabidopsis*, dove il gene SPINDLY sembra agire come regolatore negativo del segnale delle GAs e come regolatore positivo del segnale delle citochinine (Greenboim-Wainberg et al., 2005).

Lo schema descritto per *Pisum* è considerato il modello di riferimento per la regolazione ormonale dello sviluppo del frutto, soprattutto per quanto concerne l'interazione auxine-GAs. Nel modello di *Pisum* l'auxina (4-cloro-IAA) prodotta dai semi è traslocata nel pericarpo dove stimola lo sviluppo del frutto attraverso un aumento del livello di GAs, inducendo l'espressione di geni della loro biosintesi, in particolare GA-20 ossidasi e GA-3 ossidasi (Ozga e Reinecke, 2004). Lo studio delle interazioni ormonali durante lo sviluppo del frutto di altre specie, pur confermando il cross-talking tra auxine e GAs, evidenzia variazioni significative rispetto a questo modello.

In pomodoro, in particolare, la sede della sintesi di GAs non è localizzata nel pericarpo ma nei semi e nei tessuti loculari. Inoltre l'auxina stimola l'accumulo di GAs biologicamente attive (GA₁) attraverso la regolazione dell'espressione della GA-20 ossidasi ma non della GA-3 ossidasi. Nello sviluppo partenocarpico del frutto, dopo la prima fase di crescita coincidente con la fase di più intensa divisione cellulare, in cui le GAs e l'IAA, forse prodotte dagli pseudoembrioni, sembrano svolgere un ruolo significativo, l'assenza dei semi è accompagnata da livelli ormonali molto bassi rispetto ai frutti impollinati. Nella seconda fase di crescita del frutto, che nello sviluppo conseguente a fecondazione è caratterizzata da una rapida espansione cellulare, questi ormoni sembrano quindi non svolgere un ruolo dominante.

Nonostante il loro esteso impiego nella coltivazione del pomodoro autunno-invernale, per promuovere lo sviluppo partenocarpico del frutto, l'influenza dei trattamenti ormonali sulla qualità del frutto, è stata poco indagata.

La qualità di un prodotto è la somma di molteplici fattori esterni ed interni, ai quali i consumatori attribuiscono un valore. I frutti partenocarpici sono apprezzati dai

consumatori perché l'assenza dei semi, spesso duri e con un sapore sgradevole, migliora il sapore dei frutti. La sostituzione della porzione del frutto occupata dai semi con tessuto edule è un'altra caratteristica apprezzata dai consumatori. La shelf-life dei frutti partenocarpici è spesso più lunga rispetto a quella dei frutti con semi, presumibilmente perché i semi producono ormoni che stimolano la senescenza (Varoquaux et al., 2000).

Alcuni studi hanno riportato che i frutti partenocarpici genetici di pomodoro hanno più zuccheri, più solidi solubili e una minore acidità titolabile (Falavigna et al., 1978).

Confermando osservazioni precedenti il peso finale dei frutti ottenuti a seguito di trattamento auxinico hanno mostrato un peso significativamente superiore ai frutti ottenuti tramite impollinazione/fecondazione. Tra i parametri qualitativi valutati, non sono state apprezzate differenze statisticamente significative tra i due tipi di frutto, né alla raccolta né alcuni giorni dopo. Poiché, sulla base di evidenze riportate recentemente (Lemaire-Chamley et al., 2005) le diverse parti del frutto di pomodoro hanno diversa influenza sulla qualità finale del frutto, potrebbe risultare interessante valutare in questi termini la qualità dei frutti partenocarpici rispetto a quelli derivanti da impollinazione.

RINGRAZIAMENTI

Essendo giunto al termine di questi tre anni di Dottorato di Ricerca desidero, con molto piacere, esprimere i più sentiti ringraziamenti nei confronti di alcune persone. In primo luogo, il Prof Ceccarelli e Prof. Picciarelli che mi hanno sempre seguito, incoraggiato, consigliato e criticato costruttivamente durante lo svolgimento di questo lavoro di Dottorato, dimostrando in più occasioni stima e fiducia nei miei confronti.

Desidero, infine, ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato nella sezione di Fisiologia Vegetale del Dipartimento di Biologia delle Piantе Agrarie dell'Università di Pisa, in particolare il Dott. Carlo Sorce per avermi seguito in laboratorio e per l'amicizia dimostrata in questi anni.

4. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Rahman M., Thomas T.H., Doss G.J. and Howell L. 1975. Changes in endogenous Plant hormones in cherry tomato fruits during development and maturation. *Physiol Plant* 34, 39-43.
- Abdel-Rahman M. 1977. Patterns of hormones, respiration and ripening enzymes during development, maturation and ripening of cherry tomato fruit. *Physiol Plant* 39, 115-118.
- Achard P., Vriezen W.H., Van der Staeten D. and Harberd N.P. 2003. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant cell* 15, 2816-2825.
- Alabadi D., Aguero M.S., Peraz-Amador M.A., Carbonel J. 1996. Arginase, arginase decarboxylase, ornithine decarboxylase and polyamines in tomato ovaries. *Plant Physiol* 94: 1237-1244.
- Alba R., Payton P., Fei Z., Mc Quinn R., Debbie P., Martin G.B., Taksley S.D. and Giovannoni J.J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17, 2954-2965.
- Anjanasree K.N., Verma P.K. and Bansal K.C. 2005. Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening. *Current Science* 89, 1394-1399.
- Argyropoulos D., Psallida C. and Spyropoulos C. G. 2006. Generic normalization method for real-time PCR application for the analysis of the mannanase gene expressed in germination tomato seed. *The FEBS journal* 273, 770-777.
- Asahira T., Takeda Y., Nishio T., Hirabayashi M. and Tsukamoto Y. 1967. Studies on fruit development in tomato. 1. Ovule development and content of diffusible auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits in relation to their development. *Memoirs of the Research Institute for Food Science Kyoto university*, 28, 47-74.
- Atta-Aly M. A., Riad G. S., Lacheene Z. El-S and El-Beltagy A. S. 1999. Early Application of Ethrel Extends Tomato Fruit Cell Division and Increases Fruit Size and Yield with Ripening Delay. *J. Plant Growth Regulation* 18, 15-24
- Balbi V. and Lomax T.L. 2003. Regulation of early tomato fruit development by the *diageotropica* gene. *Plant Physiol* 131, 186-197.
- Barg R., Carmi N., Szechtman A.S., Dedicava B., Shabtai S. and Salts Y. 1996. Two approaches to genetically engineering parthenocarpy. *Plant Physiol* 111, 59.

- Bianco V.V. e Pimpini F. 1990. Orticoltura. Patron editore Bologna.
- Bensen R.J. and Zeevaart J. A. D. 1990. Comparison of *ent*-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. J. Plant Growth Regulation 9, 237-242.
- Bohm V., Puspitasari-Nienaber N. L., Ferruzzi M.G. and Schwartz S.J. 2002. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. J. of Agricultural and Food Chemistry 50, 221-226.
- Bohner J. and Bangerth F., 1988. Cell number size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinefolium* differing in fruit size. Physiol Plant 72, 316-320.
- Bohner J., Hedden P., Bora-Haber E. and Bangerth F. 1988. Identification and quantification of gibberellins in fruit *Lycopersicon esculentum* and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. Physiol Plant 73, 348-353.
- Brenner M.L. and Cheikh N. 1995. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: Davies PJ, editor. Plant hormones physiology biochemistry and molecular biology. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 649-670.
- Bunger-Kibler S. and Bangerth F. 1982/83. Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. Plant Growth Reg. 1, 143-154.
- Buta J.G. and Spaulding D.W. 1994. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. J. Plant Growth Regul 13, 163-166.
- Campebell A.D. and Labavitch J. M. 1991. Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectin oligomers in tomato pericarp discs. Plant Physiol 97, 706-713.
- Catala C., Rose J.K.C. e Bennett A.B. 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying protein are expressed during early tomato fruit growth. Plant Physiol 122, 527-534.

- Cao D., Hussain A. and Cheng H. 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* 233, 105-113.
- Coles J., Phillips A.L., Croker S. J., Garcia-Lepe R., Lewis M. J. and Hedden P. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase. *Plant Journal* 17, 547-556.
- Cong B., Liu J. and Tanksley S.D. 2002. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13606-13611.
- Crane J.C. 1969. The role of hormones in fruit set and development. *Hort Sci* 4, 108-111.
- De Pinto MC., Francis D., De Gara L. 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cell. *Protoplasma* 209, 90-97.
- Davidson S.E., Swain S.M. and Reid J.B. 2005. Regulation of the early GA biosynthesis pathway in pea. *Planta* 222, 1010-1019.
- Dorffling K. 1982. *Das Hormon system der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag, New York.
- Elliot R.C., Ross J.J., Smith J.J., Lester D.R. and Reid J.B. 2001. Feed-Forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *J. Plant Growth Regul* 20, 87-94.
- Falavigna A., Badino M. and Soressi G.P. 1978. Potential of the monomendelian factor *pat* in the tomato breeding for industry. *Genetica Agraria* 32, 159-160.
- Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G. and Spena A. 1999. Genetic engineering of parthenocarpic development in tomato. *Mol Breed* 5, 463-470.
- Forsburg S.L. and Nurse P. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, 227-256.
- Fos M., Nuez F. 1996. Molecular expression of genes involved in parthenocarpic fruit set in tomato. *Physiol Plantarum* 98, 165-171.
- Fos M., Nuez F. and Martinez J.L.G.. 2000. The gene *pat-2* which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology* 122, 471-497.

- Fos M., Proano K., Nuez F. and Martinez J.L.G.. 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Physiologia Plantarum* 111, 545-550.
- Frary A., Nesbitt T.C., Grandillo S., Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B. and Tanksley S.D. 2000. Fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289, 85-88.
- Frigerio M., Alabadi D., Peter-Gomez J., Garcia-Carcel L., Phillips A.L., Hedden P. and Blazquez M.A. 2006. Transcriptional regulation of gibberellin Metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142, 553-563.
- Gachon C., Mingam A. and Charrier B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J. of Experimental Botany* 55, 1445-1454.
- Garcia-Martinez J.L. and Hedden P. 1997. Gibberellins and fruit development. In FA tomas-Barberan, Rj Robins, eds, *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Clarendon Press, Oxford, UK, 263-286.
- George W.L., Scott J.W. and Splittstoesser W.E. 1984. Parthenocarpy in tomato. *Hort. Rev.* 6, 65-84.
- George B., Kaur C., Khurdiya D.S. and Kapoor H.C.. 2004. Antioxidans in tomato (*Lycopersicum esculentum*) as a function of genotype. *Food chemistry* 84, 45-51.
- George W.L., Scott J.W. and Splittstoesser W.E. 1984. Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev* 6, 65-84.
- Gianquinto G. e Pampini F. 1988. Effetti di trattamenti ormonali, del fotoperiodo e della defogliazione su pomodoro da mensa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in coltura anticipata protetta. *Riv. Colture protette* 2, 67-75.
- Gillaspay, G., Ben-David H. and Grisse W. 1993. Fruit: A development perspective. *Plant Cell* 5, 1439-14851.
- Giovannoni J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell (Suppl.)* 16, S170-S180.
- Gourguet B., Van Heusden A.W. and Lindhout P. 2005. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol* 7, 131-139.
- Greenboim-Wainberg Y., Maymon I., Borochoy R., Alvarez J., Olszewski N., Ori N., Eshed Y. And Weiss D. 2005. Cross talk between gibberellin and cytokinin: the arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant cell* 17, 92-102.

- Groot S.P.C., Bruinsma J. and Karssen C.M. 1987. The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol Plant* 71, 184-190.
- Gustafson F. 1936. Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22, 628-636.
- Gustafson F. 1942. Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot. Rev.* 8, 599-654.
- Hedden P. and Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:431-460.
- Hedden P. and Phillips A.L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in plant science* 5, 523-530.
- Ho L.C. and Hewitt J. 1986. Fruit development. In the tomato Crop, J.G. Atherton and J. Rudich, eds (New York: Chapman and Hall) pp. 201-239.
- Ho L.C. 1996. Tomato. In: Zamki E., Shaffer A.A. editors. Photoassimilate distribution in plant and crops. New York, USA: Marcel Dekker 709-772.
- Huang S., Raman A.S., Ream J.E., Fujiwara H., Cerny R.E. and Sherri M. Brown. 1998. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118, 773-781.
- Jacobsen S.E. and Olszewski N.E. 1991. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiol* 97, 409-414.
- Johnstone M.M.G., Reinecke D.M. and Ozga J.A. 2005. The auxins IAA and 4-Cl-IAA differentially modify gibberellin action via ethylene response in developing pea fruit. *J. Plant Growth Regul* 24, 214-225.
- Joubes J., Phan T.-H., Just D., Rothan C., Bergounioux C., Raymond P. and Chevalier C. 1999. Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* 121, 857-869.
- Kang H.-G., Jun S.-H., Kin J., Kawaide H., Kamiya Y. and An G. 1999. Cloning and molecular analyses of a gibberellin 20-oxidase gene expressed specifically in developing seeds of watermelon. *Plant Physiol* 121, 373-382.
- Kataoka, K., Uemachi A. and Yazawa S. 2003. Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Horticulturae* 98, 9-16.

- Kataoka, K., Uemachi A., Nonaka M. and Yazawa S. 2004. Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the “Severianin” tomato. *J. of Horticultural Science and Biotechnology* 79, 54-58.
- Kataoka, K., Okita H., Uemachi A. and Yazawa S. 2004. A pseudoembryo highly stainable with toluidine blue o may induce fruit growth of parthenocarpic tomato. *Acta hort* 637, 213-221.
- Kojima K., Tamura Y., Nakano M., Han D.-S. and Niimi Y. 2003. Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regul* 41, 99-104.
- Koorneef M., Bosma T.D.G., Hanhart C.J., Van der Veen J.H. and Zeevaart J.A.D. 1990. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 80, 852-857.
- Koshioka, M., Nishijima T., Yamazaki H., Liu Y., Nonaka M. and Mander L.N. 1994. Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4- chlorophenoxyacetic acid. *J. of Horticultural Science and Biotechnology* 69, 171-179.
- Kvarnheden A., Yao J.L., Zhan X., O'Brian I. and Morris B.A.M. 2000. Isolation of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato. *J. Exp. Bot.* 51, 1789-1797.
- Lacheene Z.A.E.S. and El-Beltagy A.S. 1986. Tomato fruit growth pattern and endogenous ethylene, indoleacetic acid and abscisic acid under normal and stress conditions. *Acta Hort* 190, 325-338.
- Lemaire-Chamley M., Petit J., Garcia V., Just D., Baldet P., Germain V., Fagard M., Mouassite M., Cheniclet C. and Rothan C. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol* 139, 750-769.
- Lin S., Splittstoesser W.E. and George W.L. 1983. A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic fruit of ‘Severianin’ tomato. *HortScience* 18, 75-76.
- Lipari V. 1979. Azione di sostanze auxiniche somministrate e differenti concentrazioni sulla produzione del pomodoro in coltura protetta. *Riv. Ortoflorofrut.* 63, 215-243.
- Llop-Tous I., Barry C.S. and Grierson D. 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol* 123, 971-978.

- Lukyanenco A.N. 1991. Parthenocarpy in tomato. In: G. Kalloo (ed.). Genetic Improvement of tomato. Monographs on Theoretical and Applied genetics 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 167-177.
- Mac Millan J. 1997. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. Nat. Prot. Rep. 14, 221-224.
- Mapelli S., Frova C., Torti G. and Sorressi G.P. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruit. Plant Cell Physiol 19, 1281-1288.
- Mapelli S., Torti G., Badino M. and Sorressi G.P. 1979. Effects of GA₃ on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. Hort Science 14, 736-737.
- Mapelli S.. 1981. Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes. Plant Sci. Lett. 22, 227-233.
- Martineau B., Summerfelt K.R., Adams D.F. and De Verna J.W. 1995. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulation of cytokinin. Biotechnology 13, 250-254.
- Martinez-Valverde I., Periago M.J., Provan G. and Chesson A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). J. Science Food and agricultural 83, 323-330.
- Mazzucato A., Taddei A.R. and Soressi G.P. 1998. The partenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. Developmental 125, 107-114.
- Mitchum M.G., Yamaguchi S., Hanada A., Kuwahara A., Yoshioka Y., Kato T., Tabata S., Kamiya Y. and Sun T.-P. 2006. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. Plant Journal 45, 804-818.
- Mok D. W.S. and M.C. Mok. 2001. Cytokinin metabolism and action. Annu. Rev. Plant Physiol. And Plant Mol. Biol. 52, 89-118.
- Møl R., Filek M., Machackova I. and Matthys-Rochon E. 2004. Ethylene Synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize. Plant Cell Physiol 45(10), 1396-1405.
- Mueller L.A., Solow T. H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin C., Wright M.H., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E.R., Menda N., Zamir D. and Tanksley D. 2005. The SOL genomics network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. Plant Physiol 138, 1310-1317.

- Nakatsuka A., Murachi S., Okunishi H., Shiomi S., Nakano R., Kubo Y. and Inaba A. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylase synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylase oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* 118, 1295-1305.
- Nitsch J.P. 1972. Perrenation through seeds and other structures. In: F.C. Steward (ed.), *Plant Physiology vol.6A: Physiology of Departement: Plant and their Reproduction*. Academic Press, Ney York.
- Noll F. 1902. Fruchtbildung ohne vorausgegangene bestaubung (Parthenokarpie) bei der Gurke. *Sitzungsb. Niederrhein. Ges. Nat. Heilk. Bonn* 13,149-162.
- Norbury C. and Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 441-470.
- Nuez F., Costa J. and Cuartero J. 1986. Genetics of the parthenocarp for tomato variety “Sub-Arctic plenty”, “75/59” and “Severianin”. *Z. Pflanzenzuchtg* 96, 200-206.
- Olimpieri I., Siligato F., Caccia R., Mariotti L., Ceccarelli N., Soressi G.P. and Mazzucato A. Fruit set driven by the tomato *parthenocarpic fruit* mutation is mediated by trascriptional de-regulation of gibberellin biosynthesis genes. In stampa.
- Olszewski N., Sun T.-P. and Gubler F. 2002 Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell (Suppl.)* S61-S80.
- Ozga, J.A. and D.M. Reinecke. 2003. Hormonal interactions in fruit development. *J. Plant Growth Regulation* 22, 73-81.
- Ozga, J.A., J. Yu and D.M. Reinecke. 2003. Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 – hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiology* 131, 1137-1146.
- Pandolfini T., Rotino G.L., Camerini S., Defez R. and Spena A. 2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional lelel: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology* 2,
- Pecaut C. and Philouze J. 1978. A *sha pat* line obtained by natural mutation. *Rep. Tom. Gen. Coop.* 28, 12.
- Philouze J. And Maisonneuve B. 1978. Heredity of natural ability to set parthenocarpic fruit in the Soviet variety *Severianin*. *Tom. Gen. Coop.* 28, 12-13.

- Philouze J. 1983. Partenocarpie naturelle chez la tomate. I- Revue bibliographique. *Agronomie* 5, 47-54.
- Philouze J. and Pecaut C. 1986. Partenocarpie naturelle chez la tomate. III- Etude de la partenocarpie due au gene *pat* (*parthenocarpic fruit*) de la lignée “Montfavet 191”. *Agronomie* 6, 243-248.
- Philouze J., Buret M., Duprat F., Nicolas-Grotte N. and Nicolas J. 1988. Caracteristiques agronomiques et physico-chimiques de lignes de tomates isogeniques, sauf pour le gene *pat-2* de parthenocarpie, dans trois types varietaux, en culture de printemps, sous serre plastique tres peu chauffee. *Agronomie* 8, 817-828.
- Philouze J. 1989. Natural parthenocarp in tomato. IV. A study of polygenic control of parthenocarp in line 75/59. *Agronomie* 9, 63-75.
- Raffo A., Leonardi C., Fogliano V., Ambrosini P., Salucci M., Gennaro L., Bugianesi R., Giuffrida F. and Quaglia G. 2002. Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6550-6556.
- Rao A.V., Waseem Z. and Agarwal S. 1998. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International* 31, 737-741.
- Rebers M., T. Kaneta, H. Kawaide, S. Yamaguchi, Y.Y. Yang, R. Imai, H. Sekimoto and Y. Kamiya. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant Journal* 17, 241-250.
- Richards D.E., King K.E., Ait-Ali T., and Harberd N.P. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 67-88.
- Robinson R., Cantliffe D. and Shannon S. 1971. Morphactin-induced parthenocarp in cucumber. *Science* 171, 1251-1252.
- Ross, J.J., O'Neill D.P. and Rathbone D.A.. 2003. Auxin-Gibberellin interactions in pea: integrating the old with the new. *J. of Plant Growth Regulation* 22, 99-108.
- Rotino G.L., Perri E., Bottini M., Sommer H. and Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat. Biotechnol.* 15, 1398-1401.
- Rotino G.L., Acciari N., Sabatini E., Mennella G., Lo Scalzo R., Maestrelli A., Molesini B., Pandolfini T., Scalzo J., Mezzetti B. and Spena A. 2005. Open field

trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. BMC Biotechnology 5:32.

- Salts Y., Wachs R., Gruissem W. And Barg R. 1991. Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruit. Plant Mol. Biol. 17, 149-150.
- Saviet M.E.. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruit and vegetables. Postharvest biology and technology 15, 279-292.
- Schwabe W.W. and Mills J.J. 1981. Hormones and parthenocarpic fruit set: A literature survey. Horticultural Abstracts 51, 661-699.
- Sjut V. e Bangerth F. 1984. Induced parthenocarpy- a way of manipulating levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 2. Diffusible hormones. Plant Growth Regulation 2, 49-56.
- Sjut V. e Bangerth F. 1982/83. Induced parthenocarpy- a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 1. Extractable hormones. Plant Growth Regulation 1, 243-251.
- Smalle J. and Van der Straeten D. 1997. Ethylene and vegetative development. Physiol Plant 100, 593-605.
- Soressi G.P. and Salamini F. 1975. A monomendelian gene inducine parthenocarpic fruits. Tomato Genet. Coop. 25, 22.
- Srivastava A. and Handa A. K. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. J. Plant Growth Regulation 24, 67-82.
- Talon M., Zacarias L. and Primo-Millo E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. Plant Physiol. 79, 400-406.
- Talon M., Zacarias L. and Primo-Millo E. 1992. Gibberellin and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. Plant Physiol 99, 1575-1581.
- Thompson K.A., Marshall M.R., Sims C.A., Wei C.I., Sargent S.A. and Scott J.W. 2000. Cultivar, Maturity and heat treatment on lycopene content in tomatoes. J. of Food Science 65, 791-795.
- Ursin V. M. and Bradford K.J. 1989. Auxin and ethylene regulation of petiole epinasty in two developmental mutants of tomato, *diageotropica* and *epinastic*. Plant Physiol 90, 1341-1346.
- Vardy E., Lapushner E.D., Genizi A. and Hewitt J. 1989. Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime. Euphytica 41, 9-15.

- Varga A and Bruinsma J. 1974. The growth and ripening of tomato fruits at different levels of endogenous cytokinins. J. Hort. Sci. 49, 135-142.
- Varga A and Bruinsma J. 1976. Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. Z. Pflanzenphysiol. 80, 95-104.
- Varoquaux F., Blanvillain R. Delseny M. and Gallois P. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. TIBTECH 18, 233-242.
- Vivian-Smith A. and Kultunow A. M. 1999. Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. Plant Physiol 121, 437-451.
- Wang H., Jones B., Li Z., Frasse P., Delalande C., Regard F., Chaabouni S., Latchè A., Pech J.-C. and Bouzayen M. 2005. The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. Plant Cell 17, 2676-2692.
- Wolbang, C.M., Chandler P.M., Smith J.J. and Ross J.J. 2004. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. Plant Physiology 134, 769-776.
- Xiao J., Li H., Zhang J., Chen R., Zhang Y., Ouyang B., Wang T. and Ye Z. 2006. Dissection of 20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. Plant Growth Regul 50, 179-189.
- Yamaguchi S. and Kamiya Y. 2000. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. Plant Cell Physiol 41, 251-257.