

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

**“ORTOFLOROFRUTTICOLTURA”**  
XXIII Ciclo.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**“Controllo ormonale nella formazione del  
frutto di pomodoro: interazioni molecolari e  
profili metabolici”**

settore scientifico-disciplinare  
(BIO/04)

Coordinatore:

Prof. Alberto Graifenberg

Tutor:

Prof. Nello Ceccarelli

Prof. Piero Picciarelli

Dottorando:

Dott. Francesco Mignolli

# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
	Sviluppo del frutto di pomodoro	4
	Gli ormoni nello sviluppo del frutto	6
	Percezione e trasduzione del segnale ormonale	7
	Metabolismo ormonale	20
	Anatomia e sviluppo cellulare nel frutto di pomodoro: ruolo dell'auxina e delle gibberelline	31
	Scopo della Tesi	37
<b>2</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	<b>38</b>
	Materiale vegetale	39
	Impollinazione e trattamenti	42
	Analisi ormonale	44
	Analisi dell'espressione genica	47
	Biosaggi ormonali	51
	Analisi istologiche e citometriche dei frutti	52
<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>56</b>
	Crescita e sviluppo dei frutti di <i>entire</i> e <i>dgt</i>	57
	Effetto delle mutazioni <i>entire</i> e <i>dgt</i> sulla risposta all'applicazione di auxina e di gibberelline	65
	Regolazione ormonale dello sviluppo dei frutti dei mutanti <i>entire</i> e <i>dgt</i>	76
<b>4</b>	<b>Discussione</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia</b>	

**Cap. 1**

# **Introduzione**

## **Sviluppo del frutto di pomodoro**

La riproduzione nel pomodoro come nella maggior parte delle angiosperme inizia con la formazione dei fiori e si conclude con la completa maturazione dei frutti e dei semi. Nella maggior parte delle piante a fiore la completa sequenza di eventi che comprendono l'impollinazione e la fecondazione è necessaria affinché ci sia la transizione da fiore a frutto (Gillaspy et al., 1993; Vivian-Smith et al., 2001). In pomodoro come molte altre specie, il polline deve germinare e produrre un tubetto pollinico capace di attraversare lo stilo e il micropilo e rilasciare i due nuclei spermatici nel sacco embrionale. Qui avviene una doppia fecondazione. Uno dei nuclei spermatici feconda la cellula uovo mentre l'altro si fonde con le due cellule aploidi chiamati nuclei polari generando i tessuti dell'embrione e dell'endosperma. Nel fiore, la parete che circonda l'ovario consiste di cellule parenchimatiche, fasci vascolari e uno strato di cellule epidermiche. Durante lo sviluppo del frutto la parete va a costituire il pericarpo, che a sua volta consiste di tre strati: epicarpo, mesocarpo ed endocarpo. Nel caso di un frutto bicarpellare (es. varietà di pomodoro *cherry*), il setto che è presente tra le due foglie carpellari divide la bacca in due distinti loculi. All'interno dei loculi, decorrente al centro, si trova il tessuto placentare a cui sono uniti i semi che con il procedere della maturazione andrà ad occupare tutti gli spazi loculari.

Il pericarpo è rivestito esternamente da una sottile cuticola che va ispessendosi durante la maturazione. Lo strato più esterno di questa epidermide è caratterizzato da cellule quasi del tutto prive di cloroplasti e non presenta aperture stomatiche (Gillaspy et al., 1993).

Nella maggior parte delle piante lo sviluppo del frutto procede seguendo quattro fasi distinte.

Fase I: comprende lo sviluppo dell'ovario all'interno del bocciolo florale fino all'antesi, è questo lo stadio in cui ne viene decisa la sorte. In seguito alla percezione di precisi segnali, l'ovario può andare verso ulteriori divisioni cellulari iniziando a formare il frutto o, diversamente, verso la senescenza e l'aborto.

Fase II: è il momento in cui le cellule dell'ovario iniziano a dividersi per un periodo di tempo stimato attorno ai 7-14 giorni dopo l'impollinazione (Mapelli, 1978;

Gillaspy et al., 1993). L'attività mitotica è massima per le cellule che andranno a formare i tessuti del pericarpo e della placenta.

Fase III: dopo il periodo di divisione cellulare, la crescita del frutto è quasi esclusivamente imputabile all'aumento di volume delle cellule (Mapelli, 1978). Nel frutto del pomodoro il volume delle cellule della placenta e del mesocarpo e del tessuto locale può, in questa fase, aumentare di oltre 10 volte. Durante questa fase inoltre, la parete dell'ovario completa lo sviluppo del pericarpo, e i tessuti placentari, a cui sono uniti i semi, si trasformano in una sostanza quasi gelatinosa costituita da cellule molto grandi, ampiamente vacuolate e dalla parete sottile. In funzione di numerosi fattori, tra cui il genotipo e l'ambiente pedoclimadico, questa fase decorre per un periodo che va dalle 5 alle 7 settimane dal termine della divisione cellulare.

Fase IV: è lo stadio che comprende la maturazione. Si caratterizza per una crescita lenta accompagnata però da profondi cambiamenti nel profilo metabolico (Gillaspy et al., 1993, Srivastava & Handa, 2005) (fig. 1-1).

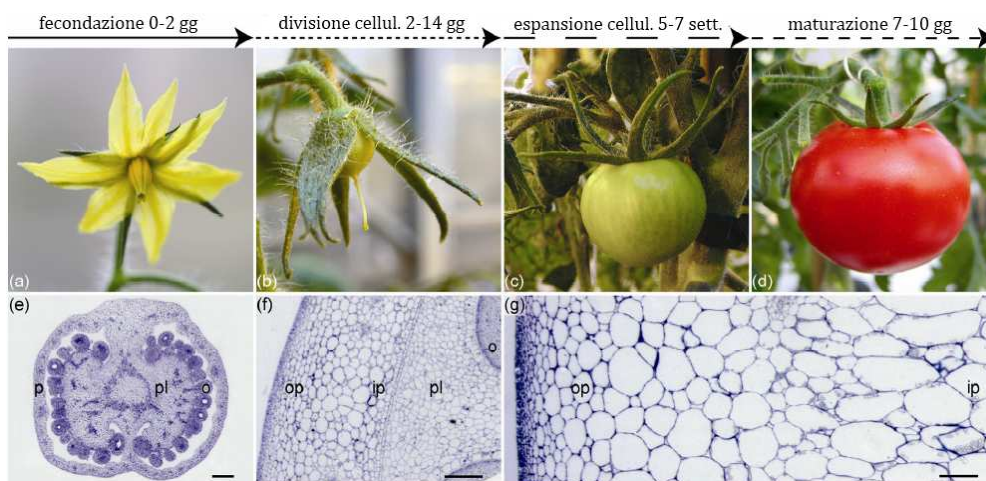


Figura 1-1 Le principali fasi della crescita e sviluppo del frutto di pomodoro. I primi due giorni dopo la fioritura l'ovario va incontro a tutti i processi che prendono parte all'allegagione o *fruit-set* (a). Successivamente, per circa 10-14 giorni i tessuti del frutto proliferano per effetto di una intensa fase di divisione cellulare (b) a cui fa seguito un lungo periodo di circa 5-7 settimane in cui il volume delle cellule aumenta rapidamente (c). Una volta raggiunte le dimensioni finali, il frutto inizia il processo che lo porterà alla completa maturazione (d). Nella foto (e), (f) e (g) rispettivamente le fotografie di sezioni ovario durante il *fruit-set*, dopo 10 giorni dalla fioritura e dopo 5 settimane. p, pericarpo; op, pericarpo esterno (*outer pericarp*); ip, pericarpo interno (*inner pericarp*); pl, placenta; o, ovuli (Adattato da de Jong et al., 2009a).

## **Gli ormoni nello sviluppo del frutto**

Già nel 1936 era stato dimostrato che l'applicazione di sostanze auxino-simili sullo stigma dei fiori di pomodoro e di altre specie determinava lo sviluppo partenocarpico del frutto. Lo stesso esito si otteneva applicando estratti provenienti da polline direttamente sull'ovario. L'ipotesi pertanto che il granulo pollinico potesse veicolare ormoni vegetali simili all'auxina stava diventando sempre più plausibile.

In tempi successivi con un'altra categoria di sostanze, le gibberelline, era stato osservato che avevano effetti sull' induzione della crescita dei frutti, ampliando così il quadro delle sostanze ormonali che potevano essere coinvolte nel programma di sviluppo dell'ovario (*reviewed* in de Jong et al., 2009a).

Sebbene sia nota fin dagli inizi del secolo scorso l'influenza dei fitormoni come l'auxina e le gibberelline nel promuovere la crescita del frutto, i meccanismi molecolari alla base di questo processo rimangono ancora in buona parte sconosciuti.

In particolare, la precisa sequenza spazio-temporale della biosintesi e dell'azione di una o più sostanze ormonali e della loro interazione reciproca durante lo sviluppo di un frutto è nota solo parzialmente. La complessità delle interazioni ormonali in molti suoi aspetti rimane ancora poco chiara, soprattutto a causa di una serie di fattori:

- Un ormone può influenzare la biosintesi di un altro ormone.
- Uno o più componente/i della via di trasduzione del segnale di un ormone può influenzare elementi della via di trasduzione di un altro ormone.
- Due o più ormoni possono agire indipendentemente l'uno dall'altro e insieme partecipano al completamento del normale sviluppo del frutto.
- Una classe di ormoni scatena un evento fisiologico che verrà completato dall'intervento di altri ormoni (Ozga & Reineke, 2003).

## Percezione e trasduzione del segnale ormonale

Gli organismi pluricellulari sono in grado di coordinare la loro crescita e sviluppo per mezzo di molecole che funzionano da segnali chimici per la comunicazione fra cellule (Chow and McCourt, 2007).

Nel caso delle piante, una singola cellula può rispondere a più di una molecola ormonale, mentre un singolo ormone è capace di influenzare lo sviluppo di più tessuti in modo diverso. Il complesso processo di sviluppo innescato da queste semplici molecole organiche richiede pertanto la comprensione del meccanismo attraverso il quale, quest'ultime sono percepite dalle singole cellule (Chow and McCourt, 2007).

### *Percezione dell'auxina*

L'acido 3-indolacetico (IAA o auxina), è stato probabilmente l'ormone vegetale maggiormente studiato poiché risulta coinvolto virtualmente in ogni processo del ciclo vitale di una pianta (Abel and Theologis, 2010).

Attualmente, nonostante esista una grande quantità di informazioni a proposito di questo ormone, il meccanismo alla base della percezione e trasmissione del segnale mediato da questa molecola appare ancora non completamente rivelato (Dharmasiri and Estelle, 2004; Dharmasiri et al., 2005).

E' noto che l'auxina è in grado di stimolare, nell'arco di pochi minuti, la trascrizione di un set di geni chiamati *primary auxin-responsive genes* di cui *Aux/IAAs*, *GH3-like* e *SAURs*, rappresentano le classi più conosciute (Abel and Theologis, 1996; Hagen and Guilfoyle, 2002). Tra questi, la famiglia genica che prende il nome di *Aux/IAA* codifica proteine che si localizzano nel nucleo e sono in grado di funzionare come repressori dei geni legati alla risposta all'auxina (Ulmasov et al., 1997). In *Arabidopsis* esistono almeno 29 geni *Aux/IAAs* e la maggior parte delle proteine che codificano contengono quattro domini altamente conservati (Hagen and Guilfoyle, 2002).

Mentre il dominio I risulterebbe cruciale in virtù di un motivo EAR (*ERF-associated amphiphilic repressor*), essenziale per il ruolo di repressore svolto dalla proteina (Tiwari et al., 2004), il dominio II, risulta fondamentale perché possa avvenire la degradazione dell'intero peptide per effetto dell'auxina (Gray et al., 2001). Infatti, alcuni mutanti di *Arabidopsis*, interessati da sostituzioni aminoacidiche all'interno del dominio II, e in particolare all'interno del *core* aminoacidico GWPPV (Reed, 2001; Abel and Theologis, 2010), erano caratterizzati da una insensibilità all'auxina dovuta alla resistenza di queste proteine alla degradazione mediata dallo stesso ormone (Vanneste and Friml, 2009).

Infine, i domini III e IV sono situati nella metà C-terminale della proteina e sono responsabili della formazione di omodimeri con altre proteine Aux/IAA e della formazione di eterodimeri con l'altra importante famiglia di fattori di trascrizione, gli *Auxin Response Factors* (ARFs) (Guilfoyle and Hagen, 2007).

Gli ARFs appartengono ad una classe di fattori di trascrizione in grado di legarsi a specifiche sequenze di DNA (TGTCTC) che prendono il nome di *Auxin-Response Elements* (AuxRE) situate nella regione promotrice di molti geni di risposta all'auxina (Ulmasov et al., 1997; Liscum and Reed, 2002).

Dei membri della famiglia multigenica degli ARFs (23 in *Arabidopsis*) alcuni possono agire sia da attivatori mentre altri da repressori, a seconda di una particolare sequenza aminoacidica nel dominio non-conservato nella porzione centrale del peptide (Guilfoyle and Hagen, 2007). Infatti, in presenza di sequenze aminoacidiche ricche in glutammina serina e leucina, gli ARFs funzionerebbero come attivatori, mentre in presenza di regioni ricche in prolina, serina, treonina agirebbero come repressori trascrizionali (Tiwari et al., 2003).

Gli ARFs che funzionano da attivatori della trascrizione vengono bloccati a seguito dell'interazione con le proteine Aux/IAA che a loro volta si legano al peptide co-repressore TOPLESS (TPL) in corrispondenza del motivo EAR sul dominio I (Szemenyei et al., 2008). Come l'auxina induce la degradazione delle proteine Aux/IAA, avviene il rilascio della repressione, e gli ARFs in questo modo sono in grado di indurre la trascrizione dei geni di risposta all'auxina (fig. 1-2).

La rimozione e la successiva degradazione delle proteine Aux/IAA avviene ad opera del proteasoma 26S nucleare dopo che alle proteine è stato aggiunta una

catena di ubiquitina. La coniugazione dell'ubiquitina richiede ATP ed è effettuata da una via multienzimatica in cui sono coinvolti tre enzimi conosciuti come enzima attivante l'ubiquitina (E1), enzima coniugante l'ubiquitina (E2) ed enzima legante l'ubiquitina (E3) (Dharmasiri and Estelle, 2004). Il processo di ubiquitinazione avviene con la formazione di un legame tio-estere di una molecola di ubiquitina su E1. La molecola di ubiquitina è poi trasferita su E2 ed infine viene legata covalentemente sulla proteina grazie all'ubiquitina ligasi E3. Il trasferimento dell'ubiquitina è ripetuto un certo numero di volte, formando una catena multi ubiquitinica. In generale è la proteina E3 che conferisce specificità a questo processo legando in maniera precisa un tipo particolare di proteina bersaglio (Dharmasiri and Estelle, 2004).

Il complesso multienzimatico SCF (Skp1/Cullin/F-box) è un tipo di E3 che è composto da quattro subunità tra cui una proteina F-box. La proteina F-box, TIR1, è stato visto legare in modo specifico gli Aux/IAA determinandone la successiva degradazione (Figura 1-2).

Il complesso SCF<sup>TIR1</sup> può legarsi direttamente alle proteine Aux/IAA e questo legame è promosso dalla presenza di auxina (Gray et al., 2001).

Dharmasiri et al., (2005) affermano che TIR1 può legarsi all'auxina biologicamente attiva comportandosi come un vero e proprio recettore. Gli stessi autori ipotizzano che il legame fra l'auxina e TIR1 porti a un cambiamento conformazionale di quest'ultima favorendo l'interazione con le proteine bersaglio. In realtà, grazie a studi di cristallografia, è stato possibile stabilire che la molecola di auxina favorirebbe l'interazione di TIR1 e i fattori Aux/IAAs mediante il riempimento della cavità tra le due proteine. L'auxina, infatti medierebbe la formazione di un continuum di residui idrofobici tra TIR1 e gli Aux/IAA funzionando come una vera e propria "colla molecolare". In questo modo è esclusa ogni tipo di relazione allosterica e relativo adattamento conformazionale di TIR1 (Tan et al., 2007).

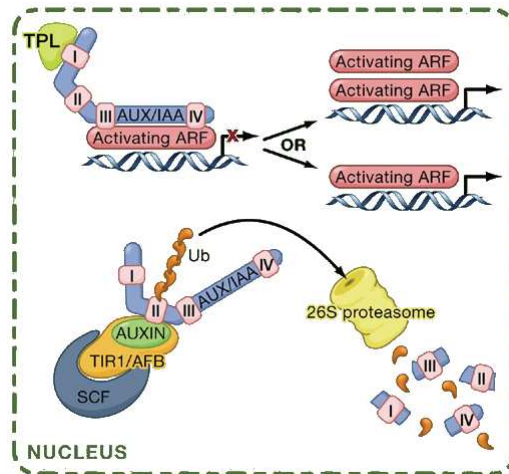


Figura 1-2 A basse concentrazioni di auxina, le proteine repressori di trascrizione Aux/IAA sono piú stabili e formano dimeri attraverso i domini III e IV con i fattori di trascrizione *Auxin Response Factors* (ARFs). Inoltre, come conseguenza dell'interazione con il dominio I degli Aux/IAA e il peptide co-repressore TOPLESS (TPL), si ha l'inattivazione degli ARFs. A concentrazioni piú alte, l'auxina favorisce l'interazione fra il dominio II dei repressori Aux/IAA e le proteine TIR1/AFB stimolando in questo modo l'ubiquitinazione delle proteine Aux/IAA e la loro successiva degradazione via proteasoma 26S. La degradazione de-reprime gli ARFs che possono cosí attivare la trascrizione dei geni. Non è noto tuttavia se gli ARFs agiscano come monomeri, come dimeri o come entrambi (adattato da Vanneste and Friml, 2009).

L'apparente semplicità del modello finora descritto è tuttavia complicato dal numero elevato di fattori di trascrizione ARFs che potrebbero competere per i siti AuxRE dei geni regolati dall'auxina, sia per le interazioni tra gli stessi ARFs e i diversi membri della famiglia degli Aux/IAA (Middleton et al., 2010). Sebbene, l'esatto significato delle diverse interazioni tra ARFs e Aux/IAAs non sia ancora chiaro, può essere suggestivo credere che la formazione di specifiche combinazioni possa stimolare o inibire la trascrizione di specifici set di geni di risposta all'auxina in determinati contesti durante lo sviluppo della pianta (Vanneste and Friml, 2009).

## *Percezione delle gibberelline*

Sebbene la biosintesi e molti aspetti del metabolismo delle gibberelline siano stati ben caratterizzati (Hedden and Philips, 2000), molto meno si conosce a proposito della percezione e trasduzione del segnale di questa vasta famiglia di ormoni.

Di tutti i membri che intervengono nella trasduzione del segnale delle gibberelline (GAs), le proteine DELLA hanno sicuramente rappresentato la categoria più studiata (Davière et al., 2008).

Le proteine DELLA agiscono come repressori trascrizionali di molti geni legati alla risposta delle gibberelline. Esse si caratterizzano per una sequenza aminoacidica in cui le sequenze DELLA e VHYNP, nel dominio N-terminale, sono mantenute altamente conservate nel regno vegetale (Jiang & Fu, 2007; Schwechheimer, 2008). Nella porzione C-terminale, sono presenti una serie di regioni anch'esse conservate (VHIID, PFYRE, RVER e SAW) e caratteristiche delle proteine regolatrici GRAS di cui le DELLA fanno parte (Bolle, 2004). Diversamente da *Arabidopsis*, per cui sono state individuate cinque diverse proteine DELLA (RGA, GAI, RGL1, RGL2 e RGL3), in altre specie come riso (SLR1) e pomodoro (SIDEELLA) è presente come singola proteina (Jiang and Fu, 2007; Martì et al., 2007).

In *Arabidopsis* la presenza di gibberelline attive innesca la catena di trasduzione del segnale riducendo il livello della proteina DELLA (RGA) (Silverstone et al., 2001). Esiste infatti una stretta dipendenza fra la scomparsa della proteina in presenza di GAs e la sequenza altamente conservata DELLA. Sempre in *Arabidopsis*, la delezione di 17 residui aminoacidici (DELLAVLGYKVRSEMA) che caratterizzano il mutante nano e insensibile alle gibberelline *gai-1*, rendono la proteina RGA apparentemente resistente alla degradazione indotta dalle gibberelline (Dill et al., 2001).

L'identificazione del recettore delle gibberelline GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) ha contribuito grandemente alla comprensione di come questi ormoni iniziano il processo che porta alla degradazione delle proteine DELLA e all'inizio della trasduzione del segnale (Hedden, 2008).

La proteina GID1, inizialmente isolata in riso, è infatti capace di interagire direttamente con gibberelline biologicamente attive e legarsi a sua volta alla proteina DELLA, SLR1 (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Il gene *OsGID1*, unico in riso, è presente tuttavia con tre omologhi in *Arabidopsis* (*AtGID1a*, *AtGID1b*, *AtGID1c*) ciascuno con un ruolo di parziale ridondanza (Nakajima et al., 2006; Griffiths et al., 2006).

Sia in GID1 di riso sia in GID1a-c di *Arabidopsis*, è stato dimostrato che GA<sub>4</sub> risulterebbe la gibberellina con la più alta affinità per i recettori e la più elevata efficienza nel provocare la degradazione della proteina SLR1 in riso, suggerendo così che sia in monocotiledoni che in dicotiledoni tutte le proteine GID1 abbiano una affinità simile per le GAs. Non è chiaro tuttavia il motivo per cui il ruolo di principale gibberellina attiva non appartenga solo alla GA<sub>4</sub> in tutte le piante ma vari da specie a specie (Ueguchi-Tanaka et al., 2007).

Sulla base di analisi strutturali della proteina GID1 è possibile affermare che il dominio centrale del peptide condivide una notevole omologia con la famiglia delle lipasi vegetali (in particolare le HSLs *hormone sensitive lipases*). Pur avendo in comune con le proteine HSL lo stesso sito allosterico, che in GID1 assume il ruolo di sito di legame per le gibberelline, il recettore delle GAs possiede in più un'estensione di 62 aminoacidi all'N-terminale (Murase et al., 2008). Sulla base di indagini biochimiche e spettroscopiche, è stato visto che il gruppo carbossilico in C6 della molecola di gibberellina verrebbe ad ancorarsi sul fondo della "tasca" del sito attivo cosicché la porzione apolare della molecola opposta al gruppo carbossilico verrebbe a trovarsi rivolta verso l'apertura. In questo modo viene indotto un cambiamento allosterico in GID1 tale che l'estensione all'N-terminale vada ad interagire con la porzione apolare della gibberellina coprendo così il sito allosterico come fosse un "coperchio". Sulla base di queste osservazioni l'estremità N-terminale funzionerebbe come un vero e proprio *switch* conformazionale. Nella situazione 'ON' la coda amino-terminale potrebbe creare una superficie su cui si legherebbe il dominio DELLA che a sua volta provocherebbe un cambiamento conformazionale nel dominio GRAS favorendone l'ubiquitinazione/degradazione (Murase et al., 2008) (fig. 1-3).

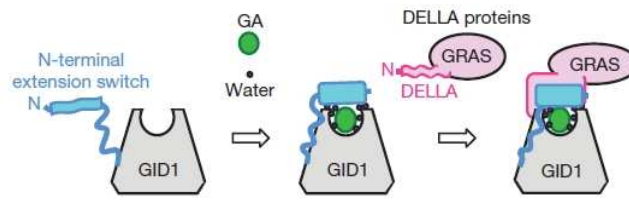


Figura 1-3 Modello dell'interazione GID1-DELLA regolata dalle gibberelline. Il legame con GA induce un cambio conformazionale della porzione N-terminale del GID1 favorendo il contatto con il dominio DELLA delle proteine DELLA che a loro volta verrebbero modificate nella conformazione. L'adattamento strutturale delle proteine DELLA favorirebbe così la loro ubiquitinazione e degradazione (adattato da Murase et al., 2008).

Sebbene il meccanismo di percezione delle gibberelline, agisca in modo analogo a quello descritto precedentemente per l'auxina, la differenza principale sta nel fatto che a dispetto delle gibberelline, l'auxina stabilisce un contatto diretto con l'F-box (TIR1, il recettore) e la proteina Aux/IAA e non provoca alcun cambiamento strutturale delle proteine coinvolte (Hedden, 2008).

E' interessante come l'evoluzione verso le angiosperme abbia portato la proteina GID1 verso una maggiore specificità per le gibberelline attive. Se si analizza il sito di interazione con le gibberelline del recettore di riso *OsGID1* e i siti dei recettori della felce *Selaginella moellendorffii*, si può notare che l'isoleucina 133 presente in riso, in *Selaginella* è sostituita da una leucina e da una valina in *SmGID1a* e *SmGID1b* rispettivamente. La sostituzione per mutagenesi in *OsGID1* di Ile con Leu o Val determina un aumento dell'affinità per  $GA_{34}$  (un prodotto della  $2\beta$ -ossidazione in C2 di  $GA_4$  e conseguenza del processo di inattivazione delle GAS biologicamente attive) e diminuisce significativamente la specificità per la gibberellina attiva  $GA_4$ . Tutto questo in ragione del fatto che Leu e Val hanno una catena laterale più breve rispetto a Ile, opporrebbero meno ostacoli all'interazione con il gruppo ossidrilico in C2 della  $GA_{34}$ . Per contro, la sostituzione di Ile con Leu o Val porterebbe a una più labile interazione con  $GA_4$  a causa di forze di van der Waals in C2 più deboli (Shimada et al., 2008).

In un modo del tutto analogo a quanto descritto per l'auxina, la degradazione delle proteine DELLA avviene in seguito all'interazione con proteine F-box (SLY1 in

*Arabidopsis* o il suo ortologo GID2 in riso), che entrano a far parte del complesso SCF (Skp1/cullin/F-box) E3 ubiquitina ligasi (Dill et al., 2004). Le proteine DELLA sono pertanto poli-ubiquinate e degradate ad opera del proteosoma 26S.

Secondo uno schema molto simile a quello descritto per l'auxina, le gibberelline sarebbero in grado di attivare la cascata del segnale promuovendo l'interazione del dominio GRAS con la subunità SLY1 o GID2 di SCF<sup>SLY1/GID2</sup> E3 ubiquitina ligasi, a cui fa seguito la degradazione delle proteine DELLA e il rilascio della repressione sui geni GA-regolati (Dill et al., 2004).

#### *Il signalling dell'auxina e delle GAs nello sviluppo del frutto di pomodoro*

Lo sviluppo del frutto di pomodoro è un processo fisiologico influenzato da fattori sia biotici che abiotici ma rigorosamente controllato nel tempo e nello spazio in cui gli ormoni svolgono un importante ruolo di coordinazione (Srivastava and Handa, 2005). Attualmente il preciso meccanismo di azione e interazione di questi ormoni nella regolazione dello sviluppo del frutto, rimane ancora parzialmente conosciuto. Nel caso dell'auxina e delle gibberelline, che rappresentano le categorie ormonali maggiormente implicate, sono pochi al momento i componenti nel sistema di regolazione del segnale che sono stati identificati e caratterizzati (Vriezen et al., 2007).

Il gene *DGT* di pomodoro è stato uno dei primi ad essere associato alla percezione del segnale dell'auxina. La lesione in questo locus presente nel mutante *diageotropica*, pur non alterando i livelli endogeni di acido 3-indolacetico nella pianta (Fujino et al., 1988) determina tutta una serie di caratteri fenotipici collegati ad una minore sensibilità all'ormone. Il mutante *dgt* presenta infatti un habitus di crescita prostrato, una ridotta dominanza apicale, un accorciamento degli internodi, un ritardo nello sviluppo del tessuto vascolare, la formazione di foglie iponastiche con elevato accumulo di clorofilla e antociani (Zobel, 1973) (fig. 1-4). Inoltre, in *dgt*, alcune delle risposte legate all'auxina risultano assenti o fortemente

attenuate come ad esempio l'allungamento e la funzionalità delle H<sup>+</sup>ATPasi nell'ipocotile in presenza di IAA (Kelly and Bradford, 1986; Coenen et al., 2002), la risposta gravitropica delle plantule (Rice and Lomax, 2000) e la sintesi di etilene stimolata dall'auxina (Zobel, 1973; Jackson, 1979; Kelly and Bradford, 1986). Anche lo sviluppo riproduttivo in pomodoro appare legato alla funzionalità della proteina DGT. Nel mutante *dgt* si assiste infatti ad un ritardo significativo dell'inizio della fioritura nonché ad una ridotta crescita dei frutti e a un minor numero di loculi e semi all'interno del frutto (Balbi and Lomax, 2003).

Dalla caratterizzazione molecolare del mutante *diageotropica*, è emerso che il gene *DGT* codifica per una ciclofilina (LeCYP1) (Oh et al., 2006). In generale le immunofiline, tra cui le ciclofiline, parvuline e proteine FKBP, appartengono alla classe delle Peptidil Prolil Isomerasi (PPasi) e sono responsabili dell'interconversione *cis/trans* del legame peptidico in



Figura 1-4 il mutante *diageotropica* (destra) a confronto con una pianta coetanea del *wild-type*, la varietà Ailsa Craig (sinistra).

presenza di residui di prolina. E' noto che la corretta funzionalità di una proteina dipende fortemente dal corretto *folding* della sua struttura terziaria. A causa però dell'ingombro sterico opposto dal gruppo pirrolidinico della prolina, la conversione in *trans* non è nettamente favorita rispetto alla *cis*. Per questa ragione l'isomerizzazione *cis/trans* del legame peptidico immediatamente adiacente ad un residuo di prolina (Xaa-Pro) avviene lentamente e rappresenta un importante fattore limitante della velocità di assemblaggio di un peptide (Romano et al., 2005; Wang and Heitman, 2005).

Un possibile ruolo delle immunofiline nel *signalling* dell'auxina potrebbe essere connesso alla presenza di proline all'interno della sequenza GWPPV del dominio II dei fattori di trascrizione Aux/IAA. Come precedentemente descritto, il dominio II rappresenta la sequenza cosiddetta *degron* dalla quale dipende la degradazione delle proteine Aux/IAA e la conseguente de-repressione del segnale auxinico. Effettivamente, l'applicazione di juglone, un inibitore specifico delle parvuline,

determina una minore espressione dei geni *auxin-regulated* e inibisce la degradazione delle proteine Aux/IAA portando alla conclusione che l'isomerizzazione delle proline del dominio II ad opera delle PPIasi potrebbe essere necessaria per l'interazione con il complesso SCF (Dharmasiri et al., 2003). Quale sia l'esatta funzione della ciclofilina codificata dal gene *DGT* all'interno del sistema di percezione e trasduzione del segnale dell'auxina in pomodoro non è ancora noto. Tuttavia, il gene risulterebbe implicato nella regolazione di alcuni membri dei geni *Aux/IAA* in fasi diverse nello sviluppo della pianta. Le differenze in termini di espressione osservate in plantule o in frutti possono infatti suggerire sia un diverso ruolo funzionale dei geni *Aux/IAA* nella regolazione dello sviluppo vegetativo e riproduttivo, sia una diversa azione del gene *DGT* in questi processi (Nebenfür et al., 2000; Balbi e Lomax, 2003).

In *Arabidopsis*, la mutazione *fwf* (*fruit without fertilization*), dà luogo alla formazione di silique mature in assenza fecondazione. Il gene, un *auxin response factor* - ARF8, sarebbe quindi strettamente connesso con il controllo dei geni per la formazione del frutto, svolgendo un ruolo di regolatore negativo. I pattern di espressione del gene *ARF8* nell'ovulo e nel gametofito durante le fasi della fecondazione suggeriscono infatti che possa agire in questi tessuti per regolarne il programma di sviluppo. In particolare, la diminuzione dell'espressione immediatamente dopo che la fertilizzazione ha avuto luogo ma che rimane pressoché costante in ovuli non fecondati, suggerisce che con la rimozione di ARF8 verrebbe meno il blocco opposto allo sviluppo del frutto (Goetz et al., 2006). Interessante notare che il gene mutato *arf8* porterebbe alla formazione di una versione troncata che se introdotta in piante *wild type* ci sarebbe una competizione con la proteina endogena AtARF8 determinando la partenocarpia dei frutti (Goetz et al., 2007). Se la stessa proteina aberrante *arf8* di *Arabidopsis* veniva fatta esprimere in pomodoro (in virtù di una stretta relazione filogenetica fra proteine ARFs fra specie diverse) si producevano anche in questo caso piante capaci di formare frutti partenocarpici a dimostrazione del fatto che anche in pomodoro la proteina ARF8 svolgerebbe un ruolo determinante nello sviluppo del frutto (Goetz et al. 2007). Secondo un modello che descrive il ruolo di ARF8 nella formazione del

frutto, la proteina andrebbe a formare un complesso con una proteina Aux/IAA (probabilmente IAA9) impedendo l'espressione dei geni di risposta all'auxina e responsabili dello sviluppo del frutto. In seguito all'impollinazione, l'aumento di auxina che ne deriva, si avrebbe la degradazione di IAA9 via SCF<sup>TIR1</sup> ubiquitina ligasi e quindi il rilascio della repressione su ARF8 iniziando così le fasi di crescita e sviluppo del frutto (Goetz et al. 2007).

Il fattore di trascrizione ARF7 costituisce un altro componente del *signalling* auxinico di cui è noto il coinvolgimento nella formazione del frutto di pomodoro. Similmente ad ARF8, l'espressione del gene *SIARF7* è mantenuta alta in ovari non impollinati e decade rapidamente (48h) dopo l'impollinazione. Dal silenziamento di *SIARF7* per mezzo di RNA-interferente (RNAi) le piante producevano frutti partenocarpici suggerendo così un ruolo di ARF7 come regolatore negativo dello sviluppo del frutto in un modo analogo a quanto dimostrato per ARF8 (de Jong et al., 2009b). Il silenziamento di ARF7 produce una diversa attivazione della via di traduzione del segnale auxinico dei frutti portando un aumento di espressione del gene *GH3-like* ma diminuendo quella di *ARF9*, *IAA1*, *IAA14* e *IAA2*, suggerendo che solo una parte della via di trasduzione del segnale auxinico dipenderebbe da ARF7 (de Jong et al., 2010).

Un dato interessante è quello per cui dal silenziamento del gene *SIARF7* si ha una diminuzione del metabolismo delle gibberelline (minore quantità di gibberelline endogene e minore espressione di *GA20ox-1*) ma un aumento dell'espressione del gene *GA-regulated (GAST1)*. Inoltre, lo sviluppo dei frutti delle linee RNAi-SIARF7 rivela molte somiglianze con quello osservato nei frutti trattati con gibberelline, ossia uno sviluppo notevole del pericarpo dovuto al solo effetto dell'espansione cellulare e una riduzione della divisione cellulare (de Jong et al. 2010).

Secondo gli stessi autori, l'impollinazione provocherebbe l'attivazione del *signalling* di auxina e gibberelline che a turno regolerebbero la divisione e l'espansione delle cellule del frutto. Tuttavia queste vie non agirebbero in modo indipendente l'una dall'altra. *SIARF7* infatti interverrebbe come regolatore negativo di una parte del *signalling* dell'auxina (promuovendo la trascrizione di geni di attenuazione del segnale auxinico es. alcuni *Aux/IAAs*) sia di quello delle

gibberelline. L'attivazione della via del segnale dell'auxina e delle gibberelline in RNAi-SLARF7 ha come effetto lo sviluppo partenocarpico del frutto.

Uno dei componenti appartenente al sistema di percezione e trasduzione del segnale dell'auxina che sembra avere un ruolo centrale nel determinare il programma di sviluppo del frutto di pomodoro, è il fattore di trascrizione Aux/IAA9 codificato dal gene *LeIAA9*.

Anche in questo caso, dal silenziamento del gene, si ottengono linee di piante in grado di produrre frutti partenocarpici con percentuali proporzionali al grado di interferenza con l'RNA di *LeIAA9*. A conferma del ruolo cruciale di IAA9 nella formazione del frutto di pomodoro è dato dal fatto che il silenziamento di altri fattori di trascrizione Aux/IAA (IAA1, IAA3 e IAA8) non porta alcuna induzione precoce della formazione del frutto (Wang et al., 2005). Indagini citogenetiche rivelano che la quantità di trascritto del gene aumenta durante tutta l'ontogenesi del meristema fiorale fino allo stadio di antesi in cui si raggiunge un massimo negli ovuli, nel tessuto sporigeno, nella placenta e nel funicolo. A seguito dell'impollinazione e fecondazione, l'abbondanza del trascritto subisce un drastico decremento rafforzando l'idea sul ruolo di IAA9 come regolatore negativo della formazione del frutto (Wang et al, 2009).

Il rilascio del gradiente di IAA9 nell'ovario, successivamente all'impollinazione, provocherebbe inoltre l'attivazione di geni connessi al sistema fotosintetico e al metabolismo degli zuccheri dimostrando che in pomodoro il ruolo del metabolismo primario potrebbe rivestire una funzione determinante per la transizione da ovario a frutto (Wang et al., 2009).

La mutazione spontanea sul locus *entire* (*e*) di pomodoro produce un fenotipo molto simile a quello osservato a seguito del silenziamento del gene *LeIAA9*. L'effetto più evidente della mutazione è a carico delle foglie riducendone fortemente la complessità (fig. 1-5).

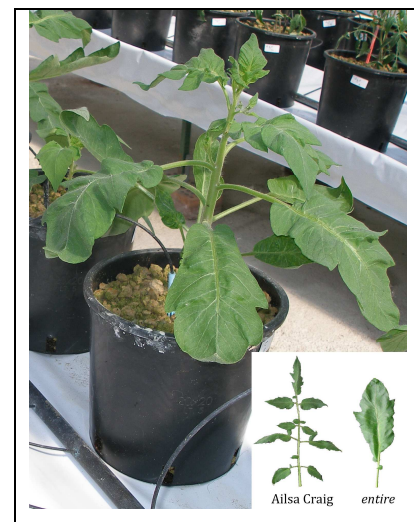


Figura 1-5 La mutazione *entire* provoca la trasformazione delle foglie da composte (*wild-type*, Ailsa Craig) a semplici (vedi riquadro in basso a destra)

Dalla caratterizzazione molecolare del mutante è emerso infatti che la mutazione *entire* è data da una delezione all'interno della sequenza codificante del gene *LeIAA9* con un effetto detto di *frameshift* determinando il termine prematuro nella traduzione del codone e quindi provocando la formazione di un peptide incompleto e non attivo.

L'unico componente del *signalling* delle gibberelline per il quale è stato dimostrato un coinvolgimento nella formazione del frutto di pomodoro è la proteina SIDEELLA. In seguito alla riduzione della quantità di mRNA del gene *SIDEELLA* in piante di pomodoro antisense, si ottiene la formazione di frutti partenocarpici. La crescita del frutto in queste piante trasformate ricorda quella indotta dal trattamento con gibberelline, vale a dire frutti di minori dimensioni privi di tessuto locale, e con pericarpo caratterizzato da una forte espansione delle cellule. E' molto probabile che la partenocarpia indotta dalla diminuzione della quantità della proteina SIDEELLA nell'ovario determini il rilascio dell'inibizione che le DELLA impongono sull'espressione geni situati a valle e responsabili della proliferazione dei tessuti del frutto. Secondo un modello semplificato, nelle piante RNAi-SIDEELLA lo sviluppo del frutto procederebbe passando direttamente alla fase di espansione cellulare (il cui controllo sarebbe affidato al segnale gibberellinico) escludendo le divisioni cellulari in mancanza degli altri stimoli ormonali provenienti dall'impollinazione (es. auxine) (Martí et al., 2007).

## Metabolismo ormonale

### *Metabolismo e trasporto dell'auxina nel frutto di pomodoro*

La biosintesi dell'acido-3-indolacetico (IAA) nelle piante, è un processo estremamente complesso sia a causa delle molteplici vie di biosintesi sia per la presenza di vie idrolitiche che a partire da coniugati (IAA-aminoacidi, IAA-zuccheri ecc...) rilasciano IAA libero (Zhao, 2010). In generale, la sintesi *de novo* di IAA avviene seguendo due principali vie, una dipendente e un'altra indipendente dal triptofano (Trp).

La via Trp-dipendente, si caratterizza per quattro diverse strade alternative che portano alla formazione dell'acido-3-indolacetico, ciascuna contraddistinta da quattro diversi intermedi: l'acido-3-indolpiruvico (IPA), l'indol-3-acetammide (IAM), la triptamina (TAM) e l'indol-3-acetaldossima (IAOx) (fig. 1-6). In generale nella via Trp-dipendente intervengono principalmente reazioni di deaminazione e decarbossilazione.

Sebbene tuttora non siano noti i composti intermedi, esistono prove sempre più evidenti del funzionamento di una via Trp-indipendente. L'esistenza infatti di mutanti di *Arabidopsis* e di mais incapaci di sintetizzare il triptofano ma ugualmente in grado di accumulare coniugati dell'acido-3-indolacetico indicano che è attiva un'altra via probabilmente indolo- e/o antranilato-dipendente (Delker et al., 2008; Woodward and Bartel, 2005).

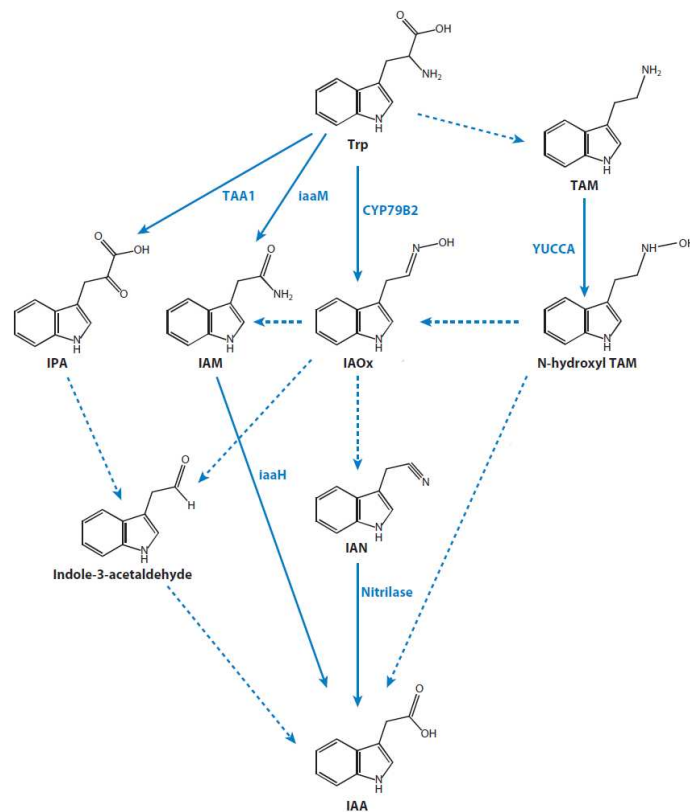


Figura 1-6 La via di biosintesi dell'auxina Trp-dipendente. Indicati con le frecce non tratteggiate gli steps metabolici noti in piante e microrganismi, mentre con le frecce tratteggiate quelli ancora non completamente definiti. IAox, indol-3-acetaldossima; IPA, indol-3-piruvato; IAM, indol-3-acetammide; IAN, indol-3-acetonitrile; TAM, triptamina. (adattato da Zhao, 2010).

Alcuni patogeni delle piante come *Agrobacterium* e *Pseudomonas* utilizzano una triptofano-2-monossigenasi (*iaaM*) per convertire il triptofano in indol-3-acetammide (IAM) che è poi idrolizzata in IAA dall'azione di una idrolasi (*iaaH*). Sebbene non sia ancora del tutto chiaro se le piante usino questa via per la biosintesi dell'auxina, la trasformazione con il gene batterico *iaaM* rappresenta un importante strumento per manipolare i livelli endogeni di IAA nella pianta (Zhao, 2010).

In pomodoro, ad esempio è possibile indurre lo sviluppo partenocarpico dei frutti per mezzo della trasformazione con il gene *iaaM* di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* controllato da un promotore placenta e ovulo-specifico *DefH9*. In questo modo è possibile ottenere frutti partenocarpici in percentuali prossime al 100% e

con caratteristiche qualitative simili a quelle dei frutti impollinati (Ficcadenti et al., 1999).

In seguito alla caratterizzazione del mutante *sulfurea* è emerso che almeno nelle prime fasi di sviluppo del frutto di pomodoro agisce principalmente la via Trp-dipendente. Il mutante infatti manifesta una ridotta capacità di sintesi dell'ormone attribuita ad un blocco nella via indipendente dall'aminoacido provocando irregolarità nello sviluppo soprattutto dei meristemi vegetativi e fiorali ma senza alcun effetto sullo sviluppo del frutto (Elhert et al., 2008). Tuttavia, è interessante osservare che la transizione dallo stadio di *mature green* a *red ripe* nel frutto si ha come uno *shift* dalla via Trp-dipendente a quella Trp-indipendente poiché, a differenza dei frutti ancora verdi, in frutti maturi è stata osservata una maggiore incorporazione di acido antranilico marcato (precursore del Trp) direttamente in IAA piuttosto che in triptofano (Epstein et al., 2002).

Il mutante di *Arabidopsis* ottenuto secondo la tecnica detta *Activation Tagging* (cioè trasformando piante un costrutto che comprende un promotore CaMV35S, Weigel et al., 2000) è stato possibile ottenere piante capaci di accumulare IAA. In seguito alla caratterizzazione di questo mutante (*yucca*) è stato possibile scoprire l'esistenza di una flavina monoossigenasi (FMO) responsabile dell'ossidazione della triptamina a N-idrossil-triptamina (Zhao et al., 2001) (fig. 1-6).

Sulla base di esperimenti di metabolismo in vivo, è stato visto che in pomodoro l'applicazione di <sup>14</sup>C3-triptofano produceva la formazione di acido-3-indol piruvico e triptamina indicando che sia la via dell'IPA che della TAM risultavano attive nella produzione di IAA (Gibson et al., 1972). Effettivamente, Expósito-Rodríguez et al., (2007) hanno dimostrato la presenza in pomodoro del gene *ToFZY*, ortologo al gene *FZY* di petunia e a *YUC1-4* di *Arabidopsis*, che codifica per una FMO coinvolta proprio nell'idrossilazione della triptamina. Sebbene in pomodoro esista omologia con altri geni putativamente considerati *YUC-like*, è possibile che non ci sia una ridondanza funzionale simile a quella riscontrata in *Arabidopsis*.

La recente scoperta di una famiglia di due geni codificanti peptidi a basso peso molecolare (53aa) chiamati AUCSIA-1 e -2 (*Auxin Cum Silencing Action*) coinvolti nella formazione del frutto, ha introdotto nel complesso sistema della formazione del frutto nuovi elementi di regolazione della biosintesi dell'IAA. Dal silenziamento

di AUCSIA (RNAi-AUCSIA) si ottengono infatti piante con spiccata tendenza alla partenocarpia facoltativa e obbligata (frutti partenocarpici anche se impollinati) e con caratteristiche riconducibili a frutti trattati con auxina o indotti dall'introduzione del gene *iaaM*. I geni *AUCSIA* sarebbero infatti preferenzialmente espressi negli abbozzi fiorali in pre-antesi per poi diminuire drammaticamente dopo i primi giorni dalla fioritura. Il motivo della partenocarpia dei frutti delle piante silenziate, è da ascriversi all'accumulo di acido-3-indolacetico nell'ovario oltre 100 volte superiore rispetto al WT e responsabile di un forte stimolo per il programma di sviluppo del frutto (Molesini et al., 2009).

Molti dei processi fisiologici di cui l'auxina è promotrice non dipendono solo dalla biosintesi e dal metabolismo, ma anche alla distribuzione e alla formazione di un gradiente dell'ormone. Tale gradiente è dato dall'azione congiunta di sintesi localizzata e distribuzione unidirezionale dovuta alla localizzazione asimmetrica di alcuni trasportatori dell'auxina all'interno delle cellule. Le principali proteine trasportatrici sono quelle appartenenti alla famiglia di AUX/LAX, responsabile del trasporto verso l'interno della cellula e dei PIN-FORMED (PIN) responsabile dell'efflusso dell'auxina (Delker et al., 2008).

Recentemente in pomodoro sono stati isolati i geni *SIPIN1*, *SIPIN2* e *SIPIN3* che conservano molte delle regioni caratteristiche della famiglia dei PIN di *Arabidopsis*. In modo particolare, l'espressione di *SIPIN1* e *SIPIN2* nell'ovario immediatamente dopo l'antesi, suggerisce che, oltre ad un'attivazione del metabolismo auxinico, anche la distribuzione dell'ormone all'interno del frutto può essere determinante nelle prime fasi di sviluppo. Si suppone, inoltre che la maggior espressione del reporter auxino-inducibile *DR5::GUS* nel picciolo nei primi giorni dopo l'impollinazione sia legata a un maggior accumulo di IAA per effetto dell'azione di *SIPIN1* e *SIPIN2* che drenerebbero l'auxina prodotta dai semi in formazione verso l'esterno (Nishio et al., 2010). E' probabile che questo fenomeno contribuisca a inibire i processi di abscissione di cui l'auxina è antagonista e promuovere invece la traslocazione di fotosintati verso il frutto (Nishio et al., 2010; Meir et al., 2010).

Il trasporto dell'auxina nell'ovario influenza profondamente lo sviluppo del frutto di pomodoro. Il blocco del trasporto di IAA per effetto dell'applicazione di inibitori come TIBA o NPA al peduncolo provoca in genere un accumulo dell'ormone

determinando lo sviluppo dell'ovario (Hamamoto et al., 1998; Serrani et al., 2010). Tuttavia, il blocco del trasporto basipeto di IAA in ovari impollinati, in cui è attiva la sintesi dell'ormone, si risolve in una diminuzione della crescita del frutto per un probabile effetto di sovradosaggio ormonale (Serrani et al., 2010). Con modalità simili al fenomeno della dominanza apicale, la cimatura delle piante o l'applicazione di NPA sull'apice provoca l'induzione della crescita di ovari non impollinati del palco sottostante. Poiché l'effetto può essere invertito applicando IAA sul punto di taglio, è plausibile credere che l'auxina proveniente dall'apice eserciti un effetto inibitorio (probabilmente indiretto mediante un'altra molecola segnale) sullo sviluppo del frutto. Per questa ragione, tanto l'IAA prodotto nell'ovario quanto quello proveniente dall'apice sembrano controllare lo sviluppo del frutto (Serrani et al., 2010).

#### *Metabolismo delle gibberelline nel frutto di pomodoro*

Il metabolismo biosintetico delle gibberelline (GAs) illustrato in figura 1-7, è operato da enzimi appartenenti a tre classi distinte: diterpene ciclastasi, monoossigenasi citocromo P450 dipendenti e le diossigenasi 2-ossoglutarato dipendenti.

A partire dalla ciclizzazione del geranilgeranil difosfato (GGDP) ad opera di due terpene sintasi, la *ent*-copalil difosfato sintasi (CPS) e la *ent*-kaurene sintasi (KS) si ha la formazione di *ent*-kaurene. L'*ent*-kaurene è convertito a GA<sub>12</sub> per ossidazione sequenziale ad opera di due monoossigenasi citocromi P450 dipendenti. Nel primo caso, una *ent*-kaurene ossidasi (KO) catalizza la conversione ad acido *ent*-kaurenoico e nel secondo, l'acido *ent*-kaurenoico è trasformato a GA<sub>12</sub> da una acido *ent*-kaurenoico ossidasi (KAO).

La GA<sub>12</sub> costituisce il punto di snodo di due vie parallele, chiamate *non-13-hydroxylation pathway* e *13-hydroxylation pathway*. Nel primo caso la GA<sub>12</sub> è

convertita a GA<sub>4</sub> (GA attiva), attraverso l'ossidazione in C20 e C3 da parte delle GA20-ossidasi (GA20ox) e delle GA3β-ossidasi (GA3ox) entrambe diossigenasi 2-ossoglutarato dipendenti. Oppure, nel caso della via 13-OH, la GA<sub>12</sub> subisce prima un'idrossilazione sul C13 ad opera di una GA13-ossidasi con formazione di GA<sub>53</sub> e successivamente a GA<sub>20</sub> e GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub> (GAs attive) ad opera delle GA20ox e GA3ox. Il prevalere di una via sull'altra sembra dipendere da una diversa attività della GA13-ossidasi e varia da specie a specie. In generale, le GA20ox catalizzano la formazione di GAs a 20 atomi di carbonio a GAs a 19 atomi di C mediante l'ossidazione sequenziale del carbonio 20 fino a CO<sub>2</sub> e la formazione del γ-lattone. L'introduzione di un ossidrile sul carbonio 3 (3β-idrossilazione) converte i precursori GA<sub>20</sub> (della via 13-OH) e GA<sub>9</sub> (della via non-13-OH) a GA<sub>1</sub> e GA<sub>4</sub>, le principali gibberelline biologicamente attive. Nel caso della GA<sub>20</sub> alcuni enzimi delle GA3ox, possono portare alla formazione di GA<sub>3</sub> (altra GA biologicamente attiva) via GA<sub>5</sub>.

I processi che portano all'inattivazione delle gibberelline, rappresentano un importante sistema di regolazione omeostatica dei livelli endogeni. Tra le reazioni coinvolte, la 2β-idrossilazione in C2, catalizzata dalla famiglia delle GA2β-ossidasi (GA2ox), rappresenta quella più caratterizzata da un punto di vista biochimico. Le GA2ox possono avere come substrato sia le gibberelline biologicamente attive, GA<sub>4</sub> e GA<sub>1</sub> che sono trasformate in GA<sub>34</sub> e GA<sub>8</sub> rispettivamente, sia i loro immediati precursori GA<sub>9</sub> e GA<sub>20</sub> da cui si ha GA<sub>51</sub> e GA<sub>29</sub>. Più recentemente è stata identificata un'altra classe di GA2ox coinvolte nell'inattivazione delle C<sub>20</sub>-GAs come la GA<sub>12</sub> e la GA<sub>53</sub> (Yamaguchi, 2008; Hedden and Phillips, 2000).



[<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> a GA<sub>9</sub> e GA<sub>4</sub> marcate, suggeriscono che una seppur ridotta attività della via non-13OH è presente (Fos et al., 2000; Serrani et al., 2008).

E' ormai noto che in pomodoro, le fasi successive all'impollinazione sono caratterizzate da un aumento quantità dei livelli di gibberelline nell'ovario e che l'applicazione di alcuni inibitori della biosintesi delle GAs o in mutanti *gibberellin-deficient* (es. *gib-1*) si ha una notevole riduzione delle dimensioni dei frutti e dei semi (Bhoner et al., 1988; Koshioka et al, 1994; Serrani et al. 2007b; Serrani et al., 2008; Groot et al., 1987). Sempre in riferimento all'importanza delle GAs nel frutto, è stato osservato che in alcuni mutanti caratterizzati da una partenocarpia spontanea (*pat*, *pat/-2* e *pat/-3pat/-4*), si registra un accumulo nell'ovario di alcune gibberelline già a partire da stadi molto precoci e alle quali viene attribuito un ruolo determinante per l'induzione dello sviluppo del frutto (Fos et al., 2000; Fos et al., 2001; Olimpieri et al., 2007).

L'aumento dei livelli endogeni durante le fasi successive all'impollinazione è difatti accompagnato da un progressivo incremento dei livelli di espressione di alcuni geni della biosintesi delle gibberelline. In modo particolare, *CPS* (copalil difosfato sintasi) e *20ox-1 -2* e *-3* (GA<sub>20</sub>-ossidasi), subiscono un notevole incremento (Rebers et al., 1999; Serrani 2007b). Circa il ruolo determinante delle 20-ossidasi nel frutto di pomodoro, è stato osservato che la partenocarpia nel mutante *pat*, è associata a una elevata espressione della *GA20ox-1* a cui si deve la maggiore concentrazione di GA<sub>20</sub> nel mutante rispetto al WT (Olimpieri et al., 2007).

Il fatto che nel frutto impollinato i livelli di GA<sub>20</sub> siano generalmente molto superiori a quelli di GA<sub>1</sub> lascerebbe pensare che lo step limitante nella biosintesi delle gibberelline nell'ovario sia quello catalizzato dalle 3β-ossidasi (Bhoner et al., 1988). Tuttavia, mentre l'applicazione su ovari non impollinati di GA<sub>20</sub> e di GA<sub>1</sub> stimola in modo più o meno analogo la crescita del frutto, l'applicazione di GA<sub>19</sub> non ha alcun effetto. Questo indica chiaramente che l'ovario non impollinato è capace di metabolizzare la GA<sub>20</sub> ma non è in grado di convertire la GA<sub>19</sub> a GA<sub>1</sub>. A questo si aggiunge il fatto che i livelli di espressione dei geni *Sl3ox-1* e *-2* non sembrano venire alterati in modo sostanziale dall'impollinazione a differenza di quanto invece avviene per quelli delle 20-ossidasi. Tutto questo concorderebbe nel

ritenere che è l'attività delle 20-ossidasi ad essere limitante per la formazione delle gibberelline attive nel frutto (Serrani et al., 2007b).

Pur tuttavia, la quasi totale soppressione dei trascritti del gene della *GA20ox-1* in pomodoro, sebbene provochi gravi anomalie nella formazione e sviluppo dei semi, non sembra alterare in modo significativo la crescita dei frutti. Lo stimolo dell'impollinazione infatti sarebbe sufficiente a innescare i processi di formazione del frutto anche se lo sviluppo degli ovuli sembra arrestarsi molto precocemente (Olimpieri et al., 2010). Anche in piante RNAi per i geni della *20ox-2* e *20ox-3*, l'allegagione e lo sviluppo del frutto non sembra subire arresto o ritardo. Tutto questo lascerebbe supporre che esista fra le 20-ossidasi di pomodoro una certa sovrapposizione funzionale durante il programma di sviluppo dell'ovario e che probabilmente è necessaria un'azione di concerto di tutte per la formazione del frutto (Xiao et al., 2006).

Analogamente a quanto osservato nei frutti impollinati, i frutti ottenuti a seguito dell'applicazione di auxina esogena (es. 2,4-D o 4-CPA) contengono concentrazioni di gibberelline ben superiori a frutti non trattati. In modo particolare la quantità di  $GA_1$  nei frutti trattati risulta superiore sia ai frutti non trattati sia a quelli impollinati. In relazione a questi dati, il trattamento con auxina esogena esercita uno stimolo sull'espressione dei geni della biosintesi delle gibberelline (GA20-ossidasi e GA3 $\beta$ -ossidasi) e reprime quelli del catabolismo (come *GA2ox-2*). Sulla base di queste indicazioni, l'auxina costituisce un importante fattore di stimolo del metabolismo gibberellinico attraverso cui è capace di mediare, almeno in parte, la crescita del frutto di pomodoro (Serrani et al., 2008). Tuttavia, la conversione di  $GA_{53}$  a  $GA_{19}$  che avviene in ovari impollinati non si osserva in ovari trattati con auxina e i diversi profili di espressione di *SIGA3ox-1* e *SIGA2ox-2* indicano che durante l'impollinazione l'auxina non costituisce l'unico segnale responsabile dello stimolo iniziale (Serrani et al., 2008).

L'inizio della biosintesi delle gibberelline nell'ovario di pomodoro a seguito dell'impollinazione può dipendere non solo dallo stimolo generato da fattori che funzionano da attivatori, ma anche dalla rimozione di altri che agiscono al contrario come repressori. Tra i fattori per i quali è nota l'azione repressiva del metabolismo delle gibberelline, gli elementi regolatori KNOX rappresentano una

delle categorie più studiate. Nella determinazione della formazione della foglia composta di pomodoro, infatti, la repressione dei geni delle GA20-ossidasi da parte delle proteine KNOX è considerato un fatto di centrale importanza (Hay et al., 2002). Nell'ovario di pomodoro l'espressione di alcuni di questi geni risulterebbe alta al momento dell'antesi e diminuendo dopo l'impollinazione. Laddove invece, come nel mutante *pat*, si ha una precoce repressione di questi fattori di trascrizione, già a partire da stadi precedenti l'antesi, si assiste alla concomitante induzione della *GA20ox-1* (Olimpieri et al., 2007).

Come introdotto precedentemente, i livelli endogeni di gibberelline attive sono il risultato di un processo sia di biosintesi sia di catabolismo o inattivazione (Hedden and Phillips, 2000). In pomodoro, l'aumento dei livelli delle gibberelline attive nell'ovario a seguito dell'impollinazione, se da una parte è legato ad un incremento dell'espressione di molti geni di biosintesi, dall'altra non sembra essere accompagnato da una riduzione della quantità di trascritti dei geni del catabolismo delle GAs (*GA2 $\beta$ -ossidasi*) (Serrani et al., 2007b).

I livelli di gibberelline attive nella pianta sono generalmente mantenuti attraverso dei meccanismi di regolazione a *feedback* e a *feed-forward*. E' noto infatti che in *Arabidopsis* il trattamento con gibberelline esogene determina una *down-regulation* di alcuni geni di biosintesi come *AtGA20ox-1* e *AtGA3ox-1* e una *up-regulation* di quelli coinvolti nel catabolismo es. *AtGA2ox-1* e -2 (Yamaguchi, 2008). In pomodoro ad esempio, il mutante *GA-deficient, gib-1*, che è incapace di convertire GGDP in CDP (Bensen and Zeevaart, 1990), presenta in diversi organi un accumulo elevato dei trascritti di *SIGA20ox-1 -2* e -3 oltre a *SIGA3ox-1* (Rebers et al., 1999). La recente analisi della sequenza promotrice del gene *SIGA20ox-1* ha permesso di stabilire che il gene possa venire regolato secondo un meccanismo a *feedback* negativo. La sequenza, di 845 bp situata a monte del gene *GA20ox-1* di pomodoro, sarebbe costituita infatti da una ripetizione di sei motivi AAAT molto simili a quelli appartenenti alla sequenza regolatrice del gene *AtGA3ox-1* di *Arabidopsis* (Martí et al., 2010). Nel gene di *Arabidopsis* queste sequenze costituiscono il sito di riconoscimento per la proteina AGF1 responsabile della regolazione a *feedback* negativo causata dalle gibberelline sull'espressione dello stesso gene (Matsushita et al., 2007).

Sebbene i meccanismi molecolari della regolazione omeostatica dei livelli ormonali non siano ancora del tutto conosciuti, sicuramente molti componenti del sistema di percezione e trasduzione del segnale ne risultano coinvolti. Sappiamo ad esempio, che nel mutante *GA-deficient* di *Arabidopsis ga1-3*, l'introduzione di mutazioni che facciano perdere la funzionalità alle proteine GAI e RGA (proteine DELLA) determinano una drastica diminuzione dei livelli di trascrizione del gene *GA4* (una *GA3β*-ossidasi) suggerendo che un aumento del *signalling* è in grado di reprimere la biosintesi delle GAs attraverso un meccanismo sempre di *feedback* (Dill and Sun, 2001). Analogamente, nel mutante *procera* di pomodoro, recentemente caratterizzato come un mutante DELLA (Jasinski et al., 2008), la quantità di gibberelline prodotte risulta nettamente inferiore rispetto al *wild-type* (Jones, 1987). Il ruolo delle proteine DELLA nella regolazione a *feedback* del metabolismo nel frutto di pomodoro è stato studiato in modo particolare in piante transgeniche antisense per il gene *SIDELLA*. Sebbene i frutti delle piante RNAi sviluppino in modo partenocarpico, i livelli di espressione dei principali geni di biosintesi, principalmente di *SIGA20ox-1 -2* e *-3*, risultano ridotti rispetto ai frutti del WT (Martí et al., 2007).

## Anatomia e sviluppo cellulare nel frutto di pomodoro: ruolo dell'auxina e delle gibberelline

Come è stato precedentemente descritto, l'auxina e le gibberelline sono tra i principali ormoni responsabili dello stimolo alla formazione del frutto. Tuttavia, ciascun ormone esercita un diverso effetto sulla morfologia dei frutti trattati (fig. 1-8).

In un frutto impollinato, i primi 10-14 giorni sono caratterizzati da una intensa attività mitotica del frutto che porta ad un aumento del numero delle cellule (Gillaspy, 1993). Il trattamento con auxina sembra imprimere, nei primi 7-10 giorni, un'accelerazione tale da avere un incremento rapido delle divisioni e del numero degli strati cellulari (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Serrani et al., 2007a). Al contrario, l'accrescimento dei frutti per effetto del trattamento con gibberelline ( $GA_3$ ) risulta più lento e con una significativa riduzione del numero di divisioni cellulari durante i primi giorni. Il pericarpo inoltre presenta un numero minore di strati cellulari ma cellule di maggiori dimensioni (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Serrani et al., 2007a).

A dispetto dei frutti trattati con auxina, in cui si ha la formazione di un tessuto locale interno in cui risultano immersi pseudo-embrioni, i frutti trattati con gibberelline appaiono internamente cavi e gli ovuli tendono a degenerare nel tempo (Serrani et al., 2007a). In esperimenti condotti con la varietà che produce frutti senza semi 'Severianin' (*pat-2*) esiste una correlazione fra la crescita dei frutti e il grado di sviluppo degli pseudo-embrioni suggerendo che in mancanza di semi, la presenza degli pseudo-embrioni svolgerebbe funzioni di vicariato come luogo di sintesi ormonale e/o di richiamo per i fotosintati dalla pianta (Kataoka et al., 2003).

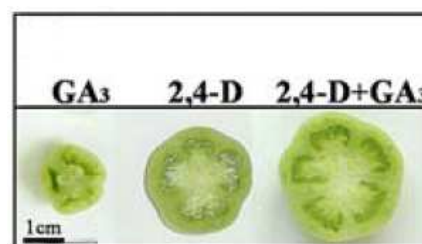


Figura 1-8 Sezione trasversale di frutti partenocarpici di pomodoro cv. Micro-Tom ottenuti dopo trattamento con  $GA_3$ , 2,4-D (un'auxina sintetica) e dalla combinazione dei due ormoni. (adattato da Serrani et al., 2007a).

Tuttavia, la risposta degli ovari all'applicazione sia di auxina che di gibberelline segue un andamento dose risposta. E' interessante osservare che l'applicazione simultanea di auxina (2,4-D) e di gibberelline (GA<sub>3</sub>) produce effetti additivi nella crescita dei frutti ed effetti sulla morfologia del tutto assimilabili a quelli che si osservano in frutti impollinati (Serrani et al., 2007a) (fig. 1-8).

L'organogenesi del frutto può essere considerata come il risultato di un delicato bilancio tra divisione ed espansione cellulare (Bohner and Bangerth, 1988). Le dimensioni finali di un frutto di pomodoro dipendono sia dalle attività mitotiche che fissano il numero complessivo di cellule in pre-antesi sia dal grado di espansione a cui queste vanno incontro nelle fasi successive (Bohner and Bangerth, 1988; Baldet et al., 2006; Cheniclet et al., 2005).

E' possibile pertanto che le minori dimensioni dei frutti trattati con gibberelline siano dovute a un ridotto stimolo della divisione cellulare. Rispetto ai frutti impollinati, il trattamento con GA<sub>3</sub> avrebbe infatti un effetto minore sull'induzione di alcuni geni legati all'attività mitotica delle cellule e del controllo del ciclo cellulare (es. alcune chinasi cicline-dipendenti) (Vriezen et al., 2007). Secondo alcuni autori, l'aumento delle dimensioni delle cellule per effetto dell'aggiunta di GA<sub>3</sub> al trattamento con 4-CPA, determinerebbe un aumento della forza di *sink* dei tessuti del frutto (anche attraverso un maggiore stimolo di alcune invertasi) e quindi un maggior richiamo di fotosintati nel pericarpo (Kataoka et al., 2009).

In generale, le dimensioni che una cellula può raggiungere durante la crescita sono controllate da un complesso sistema gerarchico di regolazione che opera a livello di singola cellula, di tessuto, di organo e di intero individuo. Sebbene il sistema con cui si coordinano i diversi livelli tra loro non sia del tutto noto, esistono prove per cui le dimensioni e la morfologia della cellula siano fortemente correlate al suo contenuto di DNA (Kondorosi et al., 2000).

Uno dei meccanismi comunemente adottati dalle piante per aumentare le dimensioni delle proprie cellule avviene proprio attraverso l'aumento della quantità di DNA nucleare mediante la successione di cicli di endoreduplicazione del DNA. Secondo la teoria del rapporto nucleo-citoplasma, infatti la quantità di

citoplasma all'interno di una cellula si adegua al contenuto di DNA presente nel nucleo (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003).

Durante il normale ciclo cellulare, la duplicazione del DNA cromosomale avviene una sola volta per ciclo ed è seguita da una divisione mitotica secondo la sequenza: G1 (gap1) – S (replicazione del DNA) – G2 (gap2) – M (mitosi). Affinché sia possibile la transizione dal ciclo di duplicazioni e divisioni cellulari al ciclo di endoreduplicazioni, è necessario che venga avviato un altro ciclo di duplicazione del DNA (fase S) e allo stesso tempo che sia arrestata la transizione verso la fase mitotica (M) (Kondorosi et al., 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003). Numerosi studi sia in piante che animali hanno dimostrato che uno degli eventi chiave dell'inizio delle endoreduplicazioni nella cellula, risulta essere la diminuzione dell'attività di alcuni fattori *mitosis-promoting* come il complesso chinasi ciclina-dipendenti/ciclina (CYC/CDK). L'attività del CYC/CDK è controllata da meccanismi di regolazione trascrizionali e post-trascrizionali come la fosforilazione e la degradazione proteolitica ubiquitina-dipendente. In questo senso, il gene *CCS52* (*cell-cycle switch 52*) riveste un'importanza centrale nel controllo dell'uscita dal normale ciclo mitotico. Il gene codifica infatti per una peptide attivatore del complesso APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*), una ubiquitina ligasi coinvolta nel processo di proteolisi delle ciclina (CYC) (Breuer et al., 2010) (fig. 1-9).

Durante lo sviluppo del frutto di pomodoro si assiste solitamente ad un incremento drammatico delle dimensioni delle cellule del pericarpo e del tessuto locale. È noto che questa espansione delle cellule contribuisce ampiamente a determinare le dimensioni e il peso finale del frutto maturo (Cheniclet et al., 2005). Contemporaneamente all'espansione delle cellule, nei tessuti del frutto ad eccezione dell'epidermide, si assiste ad un impressionante aumento dei livelli di ploidia per effetto di un arresto dell'attività mitotica e della ripetizione di cicli di endoreduplicazione che portano ad un aumento del contenuto di DNA fino a valori che possono raggiungere i 512n (Joubès et al., 1999; Joubès and Chevalier, 2000; Cheniclet et al., 2005).

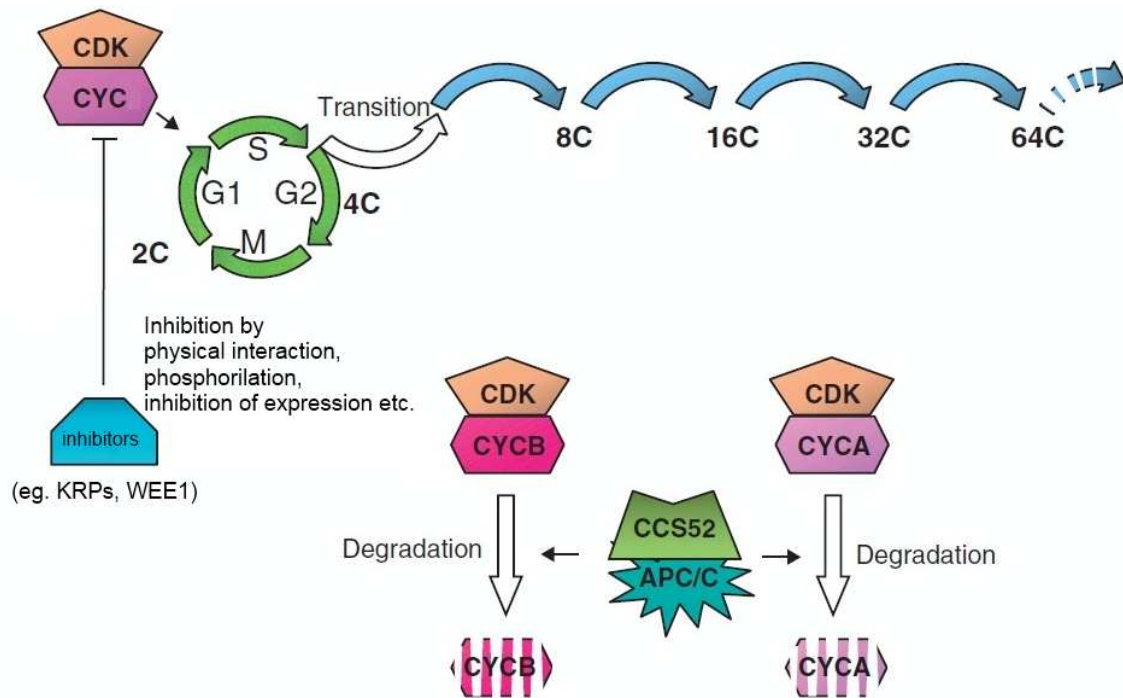


Figura 1-9 Diagramma semplificato della regolazione della transizione mitosi-endoreduplicazione nella cellula vegetale. I complessi CYCA/CDK e CYCB/CDK promuovono i cicli mitotici e sopprimono l'entrata nei cicli di endoreduplicazione. L'abbondanza di questi complessi di proteine è negativamente controllata dal peptide attivatore, CCS52 che promuove la degradazione delle cicline (CYC) attivando il complesso ubiquitina ligasi APC/C. L'attività dei complessi CYC/CDK viene regolata inoltre dalla presenza di inibitori come le proteine KRP e WEE1. (adattato da Breuer et al., 2010).

L'isolamento in pomodoro di due inibitori dell'attività delle chinasi cicline-dipendenti (CDK), *LeKRP1* e *LeKRP2*, ha permesso di identificare nuovi elementi di regolazione del ciclo cellulare che intervengono durante il processo di sviluppo del frutto di pomodoro. Mentre per il gene *LeKRP2* l'espressione sembra concentrarsi durante la fase di maturazione del frutto, *LeKRP1* ha un massimo di espressione dopo 15 giorni dall'antesi (Bisbis et al., 2006). In quest'ultimo caso, l'inizio dell'attività dell'inibitore coincide con la cessazione dell'attività di divisione delle cellule, e l'inizio della fase più intensa di endoreduplicazione nel frutto (Joubès et al, 1999).

Sebbene non possa essere considerata una regola generale, per cui all'aumento della ploidia corrisponde necessariamente un aumento delle dimensioni cellulari o viceversa (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003), in pomodoro esiste una correlazione positiva tra le dimensioni delle cellule e il valore C dei nuclei

(Cheniclet et al., 2005; Nafati et al., 2011). In effetti, tutto ciò che contribuisce ad alterare il meccanismo di controllo delle endoreduplicazioni si traduce in un aumento o una diminuzione delle dimensioni delle cellule e quindi delle dimensioni del frutto. In questo senso, la diminuzione dei trascritti del gene *SIWEE1* in pomodoro determina variazioni significative nella crescita dei frutti attraverso la diminuzione delle dimensioni delle cellule associate a un decremento del livello di ploidia nel frutto (Gonzalez et al., 2007). La proteina WEE1 svolge infatti un'azione inibitoria sul complesso CDK/ciclina andando a fosforilare il residuo di Tyr15 bloccandone l'attività. Inoltre, l'espressione gene *SIWEE1* risulta massima a 15 giorni dall'antesi, momento in cui si assiste a un netto decremento del numero di nuclei 2C e 4C e dell'espressione dei geni delle CDKs (Gonzalez et al., 2004; Chevalier et al., 2011).

Più recentemente, è stato identificato in pomodoro il gene *SICCS52A*, omologo degli attivatori del complesso APC/C e in grado di indurre endoreduplicazioni nelle cellule. E' interessante il dato secondo cui l'espressione del gene nel pericarpo aumenta progressivamente dall'antesi fino a 20 DAA, aumentando poi di nuovo fino a raggiungere un altro picco in corrispondenza dello stadio RR (*red-ripe*). Dal silenziamento del gene, mediante l'espressione costitutiva della sequenza con orientamento opposto e complementare, si determina la formazione di frutti di minori dimensioni dovuti a una forte riduzione del numero di endoreduplicazioni nelle cellule del pericarpo. Al contrario, la trasformazione di piante che sovra-esprimono il gene *SICCS52A* si ottiene un maggiore incremento della percentuale dei nuclei 32 e 64C rivelando chiaramente l'importanza del gene durante lo *switch* dalla fase di mitosi/divisione a quella di endoreduplicazione/espansione cellulare (Mathieu-Rivet et al., 2010).

Alla domanda su quali siano i segnali che consentono la transizione dal ciclo mitotico a quello delle endoreduplicazioni e in che modo questi riescano a modulare l'espressione e/o la funzionalità di certi elementi del ciclo cellulare, ad oggi le risposte sono ancora elusive. Sicuramente gli ormoni vegetali quali auxina, citochinine, etilene e gibberelline sono ottimi candidati (Breuer et al., 2010). In cetriolo ad esempio, l'applicazione di citochinina stimola molto di più le divisioni cellulari determinando un rapporto tra nuclei 2C e 4C più alto. Al contrario, gli

ovari trattati con GA<sub>3</sub> oltre ad avere una percentuale più alta di nuclei 4C (quindi un rapporto 2C/4C più basso) esprimevano meno i geni per le chinasi ciclina-dipendenti (Fu et al., 2009). In pomodoro, l'effetto dell'applicazione delle gibberelline si traduce in una riduzione del numero di cellule del pericarpo, in un aumento delle dimensioni, insieme ad un incremento dei livelli di ploidia. L'effetto dell'ormone sul contenuto di DNA risulta maggiore rispetto sia all'impollinazione che al trattamento con auxina sintetica 2,4-D. Tutto questo lascia supporre che in pomodoro l'espansione delle cellule in risposta all'applicazione di GA<sub>3</sub> avvenga per compensare la ridotta divisione delle cellule e che tale sistema di compensazione sia indotto da un'alterazione del grado di ploidia (Serrani et al., 2007a).

## Scopo della Tesi

Questo Dottorato di Ricerca ha avuto come obiettivo quello di contribuire all'esplorazione della complessa rete di interazione fra auxina e gibberelline durante lo sviluppo del frutto di pomodoro. A questo scopo sono stati impiegati due mutanti di pomodoro alterati nel sistema di percezione e trasduzione del segnale auxinico: il mutante auxino-insensibile *diageotropica*, e auxino-ipersensibile *entire*.

L'uso di questi due mutanti ci ha consentito di valutare gli effetti di una diversa percezione dell'auxina sulla crescita e sviluppo dei frutti mediante indagini citomorfologiche. Ci ha permesso inoltre di approfondire maggiormente le conoscenze sul controllo del metabolismo delle gibberelline nei frutti da parte dell'auxina e sul ruolo delle gibberelline nell'influenzare alcuni componenti del *signalling* auxinico.

## **Cap. 2**

# **Materiali e Metodi**

## Materiale vegetale

Il materiale vegetale impiegato per i diversi studi ormonali e molecolari consisteva in frutti di pomodoro raccolti nelle prime fasi di crescita. Gli esperimenti sono stati condotti con i genotipi mutanti di pomodoro (*Solanum lycopersicon* Mill.) *entire* (*e*) e *diageotropica* (*dgt*) e il corrispondente background genetico o *wild type* rappresentato dalla cv. Ailsa Craig (AC). I semi del mutante *entire* e della cv. Ailsa Craig sono stati ottenuti presso il *Tomato Genetic Resource Center* (University of California, Davis, USA) mentre i semi del mutante *diageotropica* sono stati gentilmente donati da Dr. M. G. Ivanchenko (Oregon State University, Corvallis, USA). (fig. 2-1).

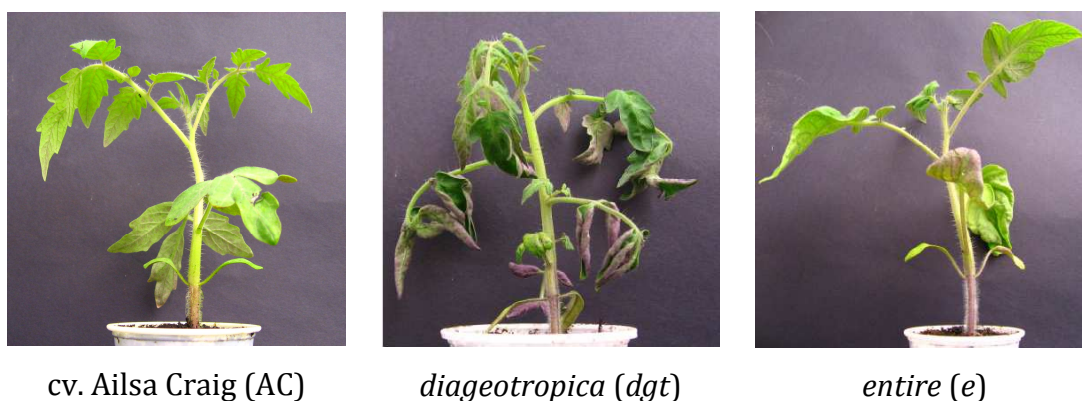


Figura 2-1 Diversità fenotipiche del *wild type* Ailsa Craig dei mutanti utilizzati.

### *Ottenimento dei doppi mutanti*

Oltre ai genotipi mutanti sopracitati, sono stati impiegati anche il mutante *dwarf* di pomodoro *gibberellin deficient-1* (*gib-1*) e il mutante *slender procera* (*pro*) al fine di selezionare dei doppi mutanti.

I doppi recessivi *gib-1/e* e *pro/e* sono stati ottenuti secondo quanto riportato da Van Tuinen et al., 1999.

In ogni caso lo *screening* dei doppi recessivi è stato effettuato basandosi sull'osservazione dei caratteri fenotipici della generazione segregante F<sub>2</sub> nel rispetto dei rapporti mendeliani attesi (fig. 2.2).

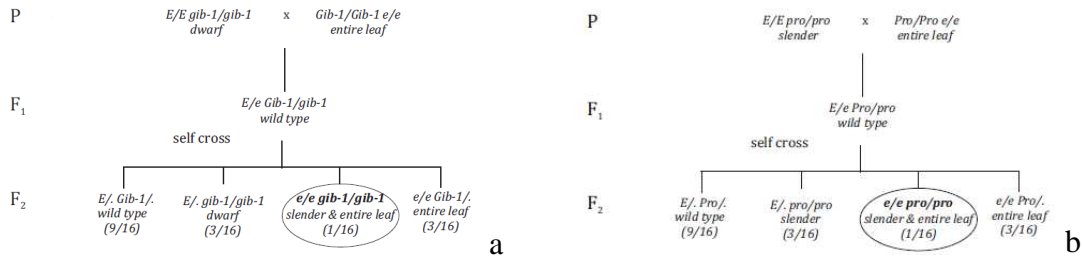


Figura 2-2 Descrizione schematica dell'isolamento del doppio mutante *e/gib-1*(a) e di *e/pro* (b)

### *Semina e coltivazione delle piante*

I semi sono stati fatti germinare in plateau alveolati di polistirolo riempiti con un substrato a base di torba (Hawita Flor®, Vechta, Germany). Durante i primi giorni dalla semina, le piantine sono state mantenute in cella climatica a 26°C di temperatura con un regime di intensità luminosa (P.A.R.) di 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  e con un fotoperiodo giornaliero di 12h.

Dopo circa trenta giorni dalla semina è stato effettuato il trapianto in vasi di plastica rotondi della capacità di 5lt colmati con un substrato composto dal 70% di torba bionda di sfagno (Lithuanian Peat, Vilnius, Lithuania) e dal 30% di pietra pomice vulcanica (Europomice, Milano, Italia).

Tutte le prove sono state condotte in serra presso il Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa (Pisa, 43° 41' 0" N, 10° 23' 0" E) nel periodo di Aprile-Giugno durante la stagioni 2007-2008, 2008-2009 e 2009-2010 (fig. 2-3)

L'irrigazione avveniva quotidianamente attraverso un impianto automatizzato a circuito aperto, con soluzione nutritiva così composta: 12 mM N-NO<sub>3</sub>, 0.5 mM N-NH<sub>4</sub>, 1.30 mM P; 8 mM K; 4 mM Ca; 1.19 mM Mg; 9 mM Na; 1.59 mM S-SO<sub>4</sub>; 9.87 mM Cl; 19.5 mM Fe; 28.6 mM B; 3.6 mM Cu; 4.5 mM Zn; 10.9 mM Mn and 0.2 mM Mo. La conducibilità della soluzione era di 3 mS cm<sup>-1</sup> e il pH di 5.8-6.0.

Per tutta la durata delle prove le piante sono state allevate seguendo i criteri delle normali cure colturali (es. legatura, rimozione dei germogli ascellari, trattamenti antiparassitari, ecc.)



Figura 2-3 Le piante sono state sistemate a 50cm ca. l'una dall'altra in filari di 15 piante su bancali rialzati di 8mt e allevate secondo le normali cure colturali (sfemminellatura, trattamenti antiparassitari ecc.)

## Impollinazione e trattamenti

### *Impollinazione manuale*

Previa riduzione a 6 del numero di fiori per racemo, le operazioni di impollinazione manuale dei fiori hanno avuto inizio a partire dal primo palco fiorale (45-50gg dalla semina).

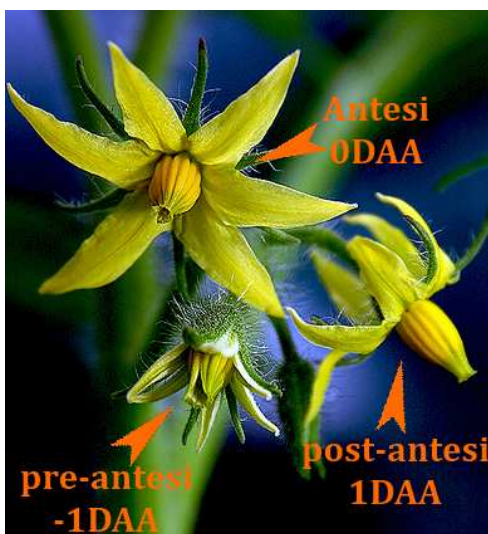


Figura 2-4 Fenologia del fiore di pomodoro

fiorale (45-50gg dalla semina).

Quando i fiori avevano raggiunto lo stadio di pre-antesi o -1DAA (-1 Day After Anthesis), fenologicamente riconoscibile dalla parziale apertura del fiore, è stata praticata l'emasculazione attraverso la rimozione dei petali insieme a tutto il cono staminale.

Il polline era ottenuto da piante della varietà Ailsa Craig per scuotimento dei singoli fiori e raccolto all'interno di micro-provette. Con l'ausilio di un fine pennello era poi depositato sugli stigmi dei fiori da impollinare

precedentemente emasculati. Infine, il fiore veniva marcato mediante l'apposizione attorno al picciolo di un'etichetta adesiva.

### *Trattamenti con regolatori di crescita*

In tutte le prove in cui era prevista l'applicazione di regolatori di crescita i trattamenti sono avvenuti solo sul 2° e 3° fiore, al fine di avere maggiore uniformità nella crescita dei frutti. Salvo in alcune eccezioni specificate di seguito, in generale all'emasculazione del fiore in pre-antesi ha fatto seguito l'applicazione diretta sull'ovario di 10µl della sostanza in soluzione acquosa, la marcatura del fiore e la raccolta del frutto dopo 10 giorni dal trattamento. Ogni sostanza è stata disciolta in etanolo puro per avere uno stock 10X. Dalla diluizione di 10µl di stock

in 1ml di una soluzione acquosa allo 0.1% di Tween 20® era ottenuta la soluzione da utilizzare per i trattamenti in cui la concentrazione di etanolo era intorno all'1%.

Secondo le modalità sopra descritte sono stati effettuati i seguenti trattamenti:

- Gibberellina GA<sub>3</sub> (Fluka, Sigma-Aldrich-Aldrich) 2µg ovario<sup>-1</sup> (Serrani et al., 2007);
- Auxina sintetica 4-CPA, 4-chlorophenoxyacetic acid, (Sigma-Aldrich) di 20ng ovario<sup>-1</sup> e 100ng ovario<sup>-1</sup> ;
- Inibitore del metabolismo delle gibberelline LAB 198999 (BASF), inibitore delle diossigenasi 2-ossoglutarato-dipendenti (Santes and García-Martínez, 1995; Rademacher, 2000; Serrani et al., 2007b) 2mM (0.02µmol ovario<sup>-1</sup>) applicato su ovari dopo 48h dall'impollinazione
- Trattamento con 4-CPA 100ng ovario<sup>-1</sup> + secondo trattamento con GA<sub>3</sub> 2µg ovario<sup>-1</sup> dopo 24h.
- Trattamento con 4-CPA 100ng ovario<sup>-1</sup> + secondo trattamento con doppia concentrazione di GA<sub>3</sub> 4µg ovario<sup>-1</sup> dopo 24h.
- Trattamento con doppia concentrazione di 4-CPA 200ng ovario<sup>-1</sup> + secondo trattamento con GA<sub>3</sub> 2µg ovario<sup>-1</sup> dopo 24h.
- Trattamento con 4-CPA 100ng ovario<sup>-1</sup> + secondo trattamento con LAB 198999 2mM (0.02µmol ovario<sup>-1</sup>) dopo 24h.

## Analisi ormonale

### *Estrazione e purificazione delle gibberelline*

L'analisi ormonale è stata condotta su ovari/frutti interi raccolti in tempi diversi dall'impollinazione.

Un grammo circa di materiale congelato è stato finemente omogeneizzato in mortaio con 5 ml di metanolo all'80% preraffreddato (rapporto 1:5 peso/vol) e recuperato in tubi Corex. e lasciato in agitazione una prima volta per 4h a 4°C in tubi Corex.

Al fine di valutare il grado di *recovery* degli ormoni endogeni durante l'estrazione e purificazione e permetterne la quantificazione, ai campioni omogenati sono stati aggiunti i seguenti standard interni marcati con deuterio: [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>12</sub> 50ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>3</sub> 50ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub> 40ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>5</sub> 25ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>19</sub> 50ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>1</sub> 50ng, [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>8</sub> 50ng e [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>29</sub> 40ng.

I campioni omogeneizzati sono stati lasciati in agitazione a 4°C per 4h, centrifugati a 4000rpm per 10 min per recuperarne il surnatante e il pellet nuovamente risospeso con 5ml di solvente di estrazione. Queste operazioni sono state ripetute almeno altre tre volte.

L'estratto è ridotto a fase acquosa facendo evaporare tutto il metanolo sotto vuoto a 40°C con evaporatore rotante per poi aggiustarne il pH portandolo a 2.8-3.0. Questa operazione determina la protonazione dei gruppi carbossilici degli ormoni rendendoli più affini ad un solvente organico.

La fase acquosa dell'estratto è stata inizialmente purificata mediante tre partizioni con acetato di etile saturo di acqua e la fase organica recuperata in palloni da 50ml. I campioni sono stati ulteriormente purificati mediante HPLC. Una volta portati a secco sono stati eluiti in 450µl di metanolo al 10% e iniettati all'interno di una colonna C18 con particelle da 5-µm (lunghezza 150 mm e diametro int. 4.6 mm; Hypersil® ODS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unita ad un sistema di pompe di un apparato HPLC (Kontron, München, Germany).

L'eluizione è avvenuta con un flusso di 1ml min<sup>-1</sup> secondo un gradiente dal 10% al 100% di metanolo miscelato con acqua bi-distillata (acidificata con acido acetico

allo 0.01%). Per 5 min veniva mantenuto MeOH al 10% per poi passare al 30% in 15 minuti e infine dal 30 al 100% in 20 minuti. La lunghezza d'onda del *detector* è stata impostata a 214nm.

Il campione è stato suddiviso in tre frazioni in base ai tempi di ritenzione delle molecole: GA<sub>8</sub> 15-16min, GA<sub>29</sub> 18-20min (Fraz. I); GA<sub>3</sub> 25-26min, GA<sub>1</sub> 27-28, (Fraz. II); GA<sub>20</sub> 33-35, GA<sub>5</sub> 33-35, GA<sub>19</sub> 36-37min GA<sub>12</sub> 40-41min (Fraz. III).

Tutte le frazioni sono state portate a secco ed eluite con 140µl di metanolo bi-distillato e raccolte in capillari di vetro. I capillari sono stati centrifugati a 1800rpm per 1-2min, portati a secco ed eluiti nuovamente con 30µl di diclorometano.

Infine, portati a secco e trimetilsilati con l'aggiunta di 10µl di *N,O-Bis(trimetil-silil) trifluoroacetammide* + 1% di *trimetilclorosilano* (Sigma-Aldrich) per 1h a 70°C.

#### *Identificazione e quantificazione delle GAs*

Le analisi sono state eseguite con un gas cromatografo (CP-3800, Varian, Palo Alto, California, USA) accoppiato con spettrometro di massa (Saturn 2200, Varian, Palo Alto, California, USA) usando una colonna capillare MEGA-1MS (fase staz. 100% polidimetilsilossano, lunghezza 30 mt, diametro int. 0.25 mm, spessore film 0.25µm; MEGA s.n.c., Milano, Italia).

I campioni derivatizzati (1µl) sono stati iniettati nella colonna capillare e sottoposti a una rampa termica. Durante le analisi la temperatura del forno era mantenuta inizialmente a 120°C per 2 min a cui seguiva l'inizio di un gradiente termico con il seguente andamento: da 120-240°C a 20°C min<sup>-1</sup>, da 240-250°C ad 1°C min<sup>-1</sup> e da 250-300°C a 20°C min<sup>-1</sup>. Il gas di trasporto era costituito da elio con un flusso di 1ml min<sup>-1</sup>, la temperatura della trappola ionica era fissata a 200°C. Le molecole erano ionizzate per impatto elettronico con un'emissione di corrente di 10 µA.

L'identificazione delle molecole è avvenuta sulla base del riconoscimento del picco prodotto dagli ioni caratteristici prodotti dalla frammentazione della molecola, unito al tempo di ritenzione in colonna specifico. I principali ioni (espressi come

rapporto massa carica<sup>-1</sup>, m z<sup>-1</sup>) delle molecole in esame sono riportati di seguito in tabella 2-1 e in figura 2-5 un esempio di uno spettro di massa di una gibberellina. La quantificazione delle molecole è stata effettuata comparando l'area del picco di uno o più ioni caratteristici dello standard interno con quella ottenuta per il corrispondente ormone endogeno.

Analita	Ioni principali (m z <sup>-1</sup> )
GA <sub>12</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>12</sub>	461/463 (M <sup>+</sup> ); 358/360
GA <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>3</sub>	562/564 (M <sup>+</sup> ); 445/447
GA <sub>20</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>20</sub>	476/478 (M <sup>+</sup> ); 433/435; 359/361
GA <sub>5</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>5</sub>	474/476 (M <sup>+</sup> ); 357/359
GA <sub>19</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>19</sub>	563/565 (M <sup>+</sup> ); 460/462; 432/434
GA <sub>1</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>1</sub>	564/566 (M <sup>+</sup> ); 447/449
GA <sub>8</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>8</sub>	535/537; 506/508
GA <sub>29</sub> /D <sub>2</sub> GA <sub>29</sub>	564/566 (M <sup>+</sup> ); 447/449

Tabella 2-1 Ioni caratteristici della frammentazione delle molecole di acido-3-indolacetico e di alcune gibberelline analizzate insieme a i corrispondenti analoghi marcati.

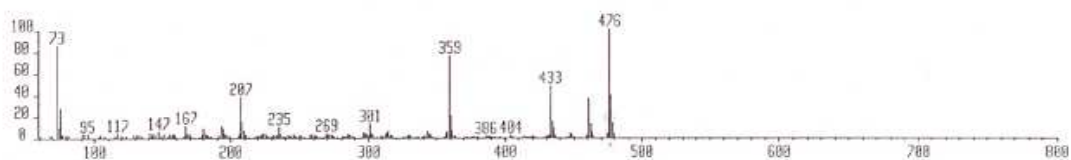


Figura 2-5 Esempio di spettro di massa completo (GA<sub>20</sub>)

## **Analisi dell'espressione genica**

### *Estrazione dell'RNA*

Per l'estrazione dell'RNA da frutti di pomodoro è stato seguito il protocollo relativo all'impiego del TRI Reagent® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, USA).

Circa 200mg di materiale vegetale congelato sono stati omogenati in mortaio aggiungendo 2ml di TRI Reagent® e in seguito centrifugati a 12000rpm a 4°C per 10min in due eppendorf da 1.5ml. Il supernatante è trasferito in nuove eppendorf e aggiungendovi 200µl di cloroformio in ciascuna. Dopo aver agitato per alcuni secondi e aver atteso 5min a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 12000rpm a 4°C per 15min. La fase acquosa (strato superficiale) era recuperata in nuovi tubi in cui venivano aggiunti 500µl di isopropanolo e lasciando in ghiaccio per 10 min. I tubi sono stati poi centrifugati a 12000rpm a 4°C per 10min. Scartato il supernatante, il pellet veniva lasciato asciugare sotto cappa per 15-30min. Una volta asciutto sono stati effettuati dei lavaggi con 1ml di etanolo al 75% e a questo punto è stato possibile risospendere l'RNA in 50µl di acqua DEPC sterile.

Il grado di polimerizzazione e la concentrazione e dell'RNA estratto sono state valutate tramite elettroforesi su gel di agarosio e tramite quantificazione via spettrofotometrica.

### *Trattamento con DNAsi*

Il DNA contaminante presente nell'RNA estratto è stata rimosso mediante un trattamento con DNAsi (*Turbo DNA-asi free*®, Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, USA).

La quantità di RNA da trattare per ciascun campione è stata calcolata in modo che la concentrazione finale di cDNA, dopo la retro-trascrizione, fosse pari a 50ng µl<sup>-1</sup>.

Il mix di reazione per il trattamento con DNAsi era così composto: 5µl di buffer 10X, 1µl di enzima DNA-asi (2unit/µl), RNA, H<sub>2</sub>O RNA-asi *free* per un volume finale

di 50µl. Dopo un'incubazione di 30min a 37°C, la reazione è stata bloccata in seguito all'aggiunta di 5µl di *inactivation buffer*. Per centrifugazione a 8000rpm per 2min sono stati recuperati 40µl di RNA trattato.

#### *Retro-trascrizione dell'RNA*

L'RNA purificato è stato retrotrascritto a cDNA mediante il kit (*High Capacity cDNA Archive kit*<sup>®</sup>, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il mix di reazione era formato da: 40µl di RNA purificato, 10µl di RT buffer 10X, 10µL di primer casuali 10X, 4µl di una miscela di dNTP (deossiribonucleotidi trifosfati) 25X, 5µl di enzima (*MultiScribe RT enzyme* 50unit/µl, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e acqua RNA-asi free per un volume di 100µl. Le impostazioni del termociclatore per al processo di retrotrascrizione erano le seguenti: temperatura iniziale a 25°C per 10' e due cicli da 1h a 37°C.

#### *Real-time PCR*

Questo strumento permette di quantificare il livello di espressione genica relativa tramite un controllo interno (gene definito *housekeeping*). Tale gene, è generalmente espresso in modo costante in tutte le parti della pianta ed è possibile in questo attribuire un valore di espressione relativa rispetto a quella del gene *housekeeping* preso in esame.

Per quanto riguarda i geni *SIGA20ox-1*, *SIGA20ox-2*, *SIGA20ox-3*, *SIGA3ox-1*, *SIGA3ox-2*, *SIGA2ox-1*, *SIGA2ox-2*, *SIGA2ox-4*, *SIGA2ox-5*, il gene *ToFZY* e il gene *housekeeping LeEF1α* sono state disegnate sonde TaqMan<sup>®</sup>. Le sequenze di tali sonde sono riportate in tabella 2-2.

Per i geni *LelAA1*, *LelAA2*, *LelAA3*, *LelAA5*, *LelAA8*, *LelAA9*, *LelAA10*, *LelAA11*, *LelAA16*, il gene *GAST1* e il gene *housekeeping LeEF1α*, sono stati disegnati primers per Real-time PCR con SYBR<sup>®</sup> Green. Le sequenze dei primers sono riportate in tabella 2-3.

Gene	Descrizione	Sequenza (5' - 3')
<i>SIGA20ox-1</i>	Primer Fw	ACTACTACACAAGCTTAAGAGCTACAAGA
	Primer Rv	CCCCCTAATTCCCATAACATTGTTCAT
	Sonda TaqMan	AACGTGTACACGTACATATAT
<i>SIGA20ox-2</i>	Primer Fw	ACGAAAATTTAAGGCATACTCAAGAAGT
	Primer Rv	ACTTGCAATGAAGAATTCCAATTTCCAT
	Sonda TaqMan	ATCCAATGTAGATCAAGACCTT
<i>SIGA20ox-3</i>	Primer Fw	TGTGGACATAGAAATGGAACCTCATG
	Primer Rv	ATGAGTCAAATAAAATTACAAAATTGATCATTTCATACAATTACTA
	Sonda TaqMan	ACCCCCACCCCTCC
<i>SIGA3ox-1</i>	Primer Fw	TCAATTAAAGAATTACCAGAATCCCATGCA
	Primer Rv	CGAGGTCGATCACTGGAATAGACT
	Sonda TaqMan	ATCATTATACTCAAGAAAATTC
<i>SIGA3ox-2</i>	Primer Fw	GGCGTCCAAGTAGGTTAATATAACAAGA
	Primer Rv	ATTGATCTAAATTCTTCCAATGGGTCAAGA
	Sonda TaqMan	AACATAAGTAGAGAGATATTTTC
<i>SIGA2ox-1</i>	Primer Fw	AAAGCTACTTATTCGATGAGACTTGGG
	Primer Rv	AAAAAATTCCAAATTTCAAACCTTAAGACGTTTTGATT
	Sonda TaqMan	TCAGACTACAATCAGAAAATGA
<i>SIGA2ox-2</i>	Primer Fw	GAAAAAATTGCAGCCTCATAATAATTTTATTTTTTGGT
	Primer Rv	AGCATCTTGACAACCCATAATTCCT
	Sonda TaqMan	TCTAAAAGTGACAAAGTCCC
<i>SIGA2ox-4</i>	Primer Fw	GGTCCTATTTGAGAAAAGTTTATAATAACGGTGTA
	Primer Rv	AGTCCTTCCTAAAGAGTCGGATCTT
	Sonda TaqMan	ACTTAAACTCTTTGAGAAAATAG
<i>SIGA2ox-5</i>	Primer Fw	CCTGTTTGAGAAAATTTGGAACCTCAT
	Primer Rv	ATGGTATATTTGCGGAGGAATCTATTAATATGTAC
	Sonda TaqMan	ACAAAGCCAGAATTTAAAG
<i>ToFZY</i>	Primer Fw	CTGTAGACATAACGCCATTCTCAT
	Primer Rv	AGGGCCATAGCTATTGAAAATGTTGA
	Sonda TaqMan	AAATATGCACAGAATTTCT
<i>SIEF1<math>\alpha</math></i>	Primer Fw	TGCTTGCTTTCACCCTTGGT
	Primer Rv	CGATTTTCATCATACCTAGCCTTGGA
	Sonda TaqMan	CTGCTGTAACAAGATGGATGC

Tabella 2-2 Elenco dei primers e sonde TaqMan® per l'analisi dei trascritti mediante Real-Time PCR dei principali geni della biosintesi delle gibberelline, del gene *ToFZY* e dell'*housekeeping SIEF1 $\alpha$*

Gene	Descrizione	Sequenza (5' - 3')
<i>LeIAA1</i>	Primer Fw	CCAGGGAGGACAGATGAAGA
	Primer Rv	CTTGGCAACAGGTGGAGTTT
<i>LeIAA2</i>	Primer Fw	GAACCACCACAAAAAGCACA
	Primer Rv	TTAAATAAGCCGCACCATCC
<i>LeIAA3</i>	Primer Fw	GCCACCAGTTCGATCATAACA
	Primer Rv	ATAAGGTGCTCCATCCATGC
<i>LeIAA8</i>	Primer Fw	TGGGAGATCGTTCGAGTTGAAGC
	Primer Rv	TTCACTCAAGCCAGTTGGTATCTG
<i>LeIAA9</i>	Primer Fw	TCTACTGGCTTCTTCAACTTC
	Primer Rv	CAGATAGACCCATATAGTTTCG
<i>LeIAA10</i>	Primer Fw	GACTTCTCAAAGCTTGATCGAGAG
	Primer Rv	TGAAATCTTTCATTCTTGGACAA
<i>LeIAA11</i>	Primer Fw	TTAACGGACGTGAAGCTGAATCC
	Primer Rv	ACGGTGCTCCATCCATGCTAAC
<i>LeIAA16</i>	Primer Fw	ACTGGAATCGAGTAATAAGAAC
	Primer Rv	TATTCTTCTTCTCCTTCATGTTA
<i>GAST1</i>	Primer Fw	ACAATGGCTGGGAAAATGAG
	Primer Rv	CTCTGTTGTTGCTGCTGCTC
<i>LeEXP2</i>	Primer Fw	CCTCCTCTCCAACATTTTGATT
	Primer Rv	CTTCGAAAAGATACAGGGACGA
<i>LeSAUR</i>	Primer Fw	GGCTATCCGTATGCCTCGTA
	Primer Rv	CCACCCATCGGATGATTAACA
<i>LeGH-3</i>	Primer Fw	ACCCCATGACCCTACATCAA
	Primer Rv	GGAGGATGTCTCCGACTCTG
<i>SIEF1<math>\alpha</math></i>	Primer Fw	GCTGCTGTAACAAGATGGATGC
	Primer Rv	GGGGATTTTGTTCAGGGTTGTAA

Tabella 2-3 Elenco dei primers per Real-Time PCR (SYBR® Green) dei principali geni di *Aux/IAAs* di pomodoro, del gene *LeEXP2*, *GAST1*, *LeSAUR*, *GH-3* e dell'*housekeeping SIEF1 $\alpha$* .

Per l'amplificazione con primers e sonde *TaqMan*® La miscela di reazione era formata da: 7.5 $\mu$ l di buffer 2X (*TaqMan Universal PCR Master Mix*®, Roche), 0.75 $\mu$ l di una miscela di primer e sonda specifici del gene 20X (*TaqMan gene Expression Assays*®, Applied Biosystems), 200ng di cDNA (4 $\mu$ l di cDNA 50ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) del campione

da analizzare e 2.75µl di *water molecular biology reagent* (Sigma-Aldrich) per volume finale di 15µl.

Per l'amplificazione con primers *SYBR® Green* invece la miscela di reazione era la seguente: 7.5µl di Miscela di reazione *2X Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0.45µl di Primers Forward (10µM), 0.45µl di Primers Reverse (10µM), 80ng di cDNA (4µl di cDNA 20ng/µl) e 2.6µl di *water molecular biology reagent* (Sigma-Aldrich) per volume finale di 15µl.

La reazione di amplificazione è avvenuta seguendo le seguenti condizioni: una prima fase a 50° per 2 min, a cui segue una a 95°C per 10min, e 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15sec. e di *annealing* a 57 (primers *SYBR® Green*) o 60°C (primers *TaqMan®*) per 1min.

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 Biosystems).

## **Biosaggi ormonali**

La risposta all'applicazione dell'auxina in segmenti di ipocotili di pomodoro è stata valutata allestendo un esperimento di dosaggio ormonale secondo quanto riportato da Kelly and Bradford 1986 e da Woodhead et al., 1997.

Semi di pomodoro di WT (AC), *entire* e di *diageotropica* sono stati sterilizzati con ipoclorito al 4% + Tween 20® e fatti germinare su carta da filtro al buio. Dopo 6-7 giorni dalla semina a ciascuna plantula è stato asportato un segmento di ipocotile di 6.5mm immediatamente al di sotto dell'uncino apicale. Le porzioni di ipocotile sono state subito immerse in una soluzione 2.5mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> per almeno 2-3h.

Soluzioni contenenti *Basal Medium* (2.5mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM di KCl, 1mM di Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O e 3% di saccarosio; pH 5.2) e dosi crescenti di acido-3-indolacetico

( $1 \cdot 10^{-8}M$ ,  $1 \cdot 10^{-7}M$ ,  $1 \cdot 10^{-6}M$ ,  $1 \cdot 10^{-5}M$ ,  $1 \cdot 10^{-4}M$ ) sono state versate in aliquote da 10ml in piastre petri contenenti 15-20 segmenti di ipocotile.

Le piastre sono state mantenute in agitazione su piastra orbitante ( $70 \text{ round min}^{-1}$ ) a temperatura ambiente e in condizioni di luce normale per 20h. Al termine dell'incubazione, gli ipocotili sono stati fotografati e misurati utilizzando un programma per analisi delle immagini digitali ImageJ®.

Il saggio dell'allungamento dell'ipocotile in risposta alle gibberelline è stata allestito utilizzando plantule di WT (AC), *entire* e *diageotropica*. Semi pregerminati (inizio dell'emissione della radichetta) sono stati sistemati su agar allo 0.7% in presenza di concentrazioni crescenti di  $GA_3$  ( $1 \cdot 10^{-8}M$ ,  $1 \cdot 10^{-7}M$ ,  $1 \cdot 10^{-6}M$ ,  $1 \cdot 10^{-5}M$ ,  $1 \cdot 10^{-4}M$ ) all'interno di barattoli in vetro. Al termine di un periodo di 7 giorni di in condizioni di luce e temperatura controllate ( $23^\circ C$  di,  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  di intensità luminosa e 12h di fotoperiodo giornaliero) è stata misurata la lunghezza degli ipocotili delle plantule.

## **Analisi stologiche e citometriche dei frutti**

### *Preparazione dei vetrini*

Campioni rappresentativi di frutti di pomodoro raccolti dopo 10 giorni dall'impollinazione/trattamento sono stati sezionati longitudinalmente e fissati sotto vuoto per 1h con FAA, una miscela contenente formaldeide al 40%, ac. acetico glaciale, etanolo e acqua, in rapporto di 10:5:50:35 v/v. Dopo 24h a  $4^\circ C$  la soluzione di fissaggio è stata sostituita con etanolo al 70% e i campioni mantenuti a  $4^\circ C$  fino al momento delle analisi. I campioni sono stati prima disidratati aumentando progressivamente la percentuale di etanolo dal 70 al 100% ed in seguito inclusi in xilene mediante passaggi con miscele xilene/etanolo 1:3, 1:1, 3:1 e xilene 100%. Dopo aver rimosso lo xilene, i campioni sono stati immersi in

paraffina fusa a 60-70°C e mantenuti in stufa a 60°C per almeno 48h. Durante questo tempo la paraffina è stata cambiata più volte (almeno 4 volte) fino alla completa eliminazione dello xilene dai tessuti. Una volta in paraffina, è stato possibile tagliare il materiale con l'ausilio di un microtomo praticando sezioni da 10µm. Prima della colorazione, le sezioni sono lasciate distendere su un velo d'acqua tiepida su vetrini in polilisina e lasciate asciugare *over night*.

Previa eliminazione della paraffina mediante immersione dei vetrini in xilolo e etanolo da 100 allo 0%, la sequenza per la colorazione dei vetrini è stata la seguente: ematossilina (per 3min.), risciacquo in acqua distillata, eosina (per 1min.) e di nuovo risciacquo. A questo punto è stato possibile nuovamente disidratare e includere in xilene le sezioni colorate e chiudere definitivamente i vetrini con il montante DPX (Fluka, Sigma-Aldrich-Aldrich) e copri-oggetto.

#### *Microscopia e determinazione dei parametri cellulari*

Le diverse sezioni di frutto sono state osservate al microscopio ottico (Observer Z1, Zeiss Oberkochen, Germany) e fotografate con fotocamera digitale.

Tutte le misure sono state effettuate su sezioni di frutto appartenenti a tre campioni indipendenti individuati come rappresentativi delle diverse popolazioni.

La determinazione delle dimensioni cellulari è stata effettuata distinguendo gli strati di cellule del mesocarpo esterno (*EM-external mesocarp*) e del mesocarpo interno (*IM-internal mesocarp*) rispettivamente compresi fra l'epidermide e l'anello dei fasci vascolari e tra l'anello dei fasci vascolari e l'endocarpo (fig. 2-6).

La superficie media ottenuta misurando 90-100 cellule per ogni replicato è stata determinata utilizzando il software di pubblico dominio imageJ®.

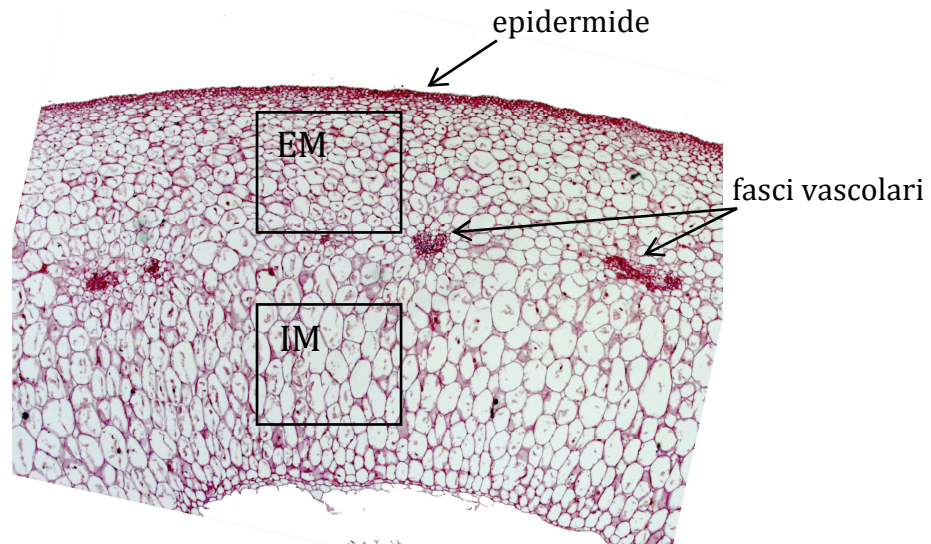


Figura 2-6 Sezione trasversale del pericarpo di un frutto di pomodoro. I rettangoli circoscrivono le cellule appartenenti al mesocarpo esterno e interno EM ed IM rispettivamente.

La determinazione del numero di strati cellulari è stata stimata contando il numero di cellule lungo una linea attraverso il pericarpo nelle zone comprese fra i fasci vascolari e perpendicolare all'epidermide (Serrani et al., 2007a).

#### *Determinazione della ploidia*

Il contenuto di DNA nucleare e il grado di ploidia è stato determinato su frutti raccolti dopo 10 giorni dall'impollinazione e dai trattamenti ormonali.

Una quantità pari a circa 1-2 grammi di pericarpo e tessuto locale provenienti da almeno 5 diversi frutti per ogni trattamento è stata blandamente tritata con una lametta su una capsula petri in presenza di 0,5ml del buffer per l'isolamento dei nuclei (*CyStain PI Absolute P, solution A: Nuclei Extraction Buffer*, Partec GmbH, Münster, Germany). Dopo 60-90 secondi di incubazione l'estratto è passato attraverso filtri in nylon da 50µm (*CellTrics®*, Partec GmbH, Münster, Germany) e colorato aggiungendo 2ml del tampone per la colorazione dei nuclei preparato

aggiungendo *CyStain PI Absolute P solution B: Staining Buffer, + Propidium Iodide Solution + RNase A*, (*CyStain PI Absolute P*, Partec GmbH, Münster, Germany).

Circa 5000 nuclei, recuperati nell'estratto filtrato, sono stati analizzati con citofluorimetro (FACSCanto™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) equipaggiato con una laser a 488nm per la fluorescenza dello ioduro di propidio.

La misura della fluorescenza emessa è stata riportata su scala semi-logaritmica e utilizzando l'estratto di ipocotili di plantule eziolate di AC è stato possibile avere i riferimenti del valore 2C e 4C del contenuto di DNA. L'analisi dei dati, infine, è stata realizzata con il programma FacsDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). La media del valore C (*MCV mean C value*) è calcolata come la somma del numero dei nuclei di ciascuna grado ploidia moltiplicato per il suo corrispondente ciclo di endoreduplicazione diviso per il numero di nuclei totale.

# **Cap. 3**

# **Risultati**

## Crescita e sviluppo dei frutti di *entire* e *dgt*

### *Effetto delle mutazioni sulla crescita dei frutti impollinati*

L'andamento della crescita dei frutti, espresso come incremento ponderale, durante i primi dieci giorni dall'impollinazione rivela un *trend* sostanzialmente identico tra *entire* e il AC fino a 8 giorni. In *dgt* si assiste invece a un significativo ritardo della crescita già a partire dai primi giorni dall'impollinazione (fig. 3-1).

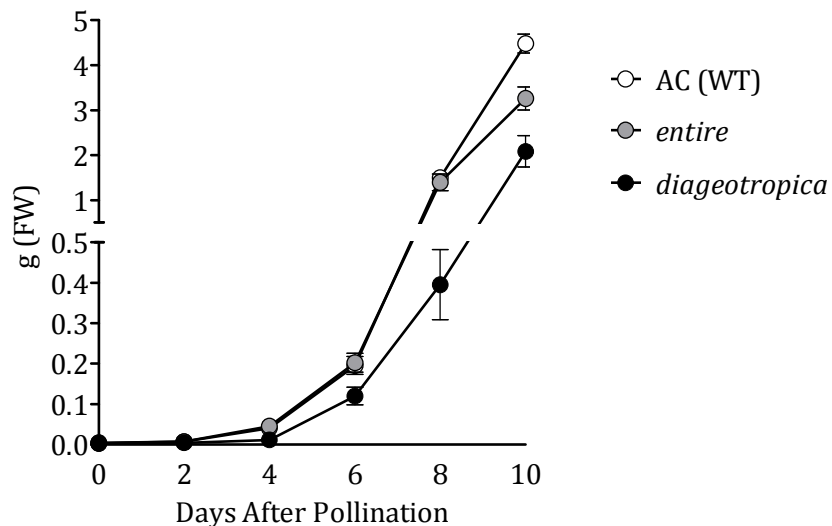


Figura 3-1 Andamento del peso dei frutti da 0 a 10 giorni dall'impollinazione. Ciascun punto rappresenta la media del peso di circa 30 frutti  $\pm$  SEM.

### *Effetto delle mutazioni sulla morfologia dei frutti impollinati*

Al fine di chiarire maggiormente il ruolo delle mutazioni nel complesso meccanismo che regola la crescita e la morfologia del frutto, il pericarpo di frutti impollinati e raccolti dopo 10 giorni, è stato oggetto di osservazioni al microscopio (fig. 3-2 a-c) e di analisi di alcuni parametri anatomici (tabella 3-1).

Per quanto riguarda *entire*, al minore spessore del pericarpo rispetto ad AC (fig. 3-2 a, b; tabella 3-1) si affianca un minore numero di strati cellulari che separano l'epidermide dall'endocarpo. Per quanto riguarda le dimensioni delle cellule, non si osservano differenze sia nella porzione esterna (EM, *external mesocarp*) sia per quella interna (IM, *internal mesocarp*) del pericarpo.

Diversa è la situazione per il mutante *dgt*. In questo caso, a fronte di un ugual numero di cellule che vanno a formare il pericarpo, si osserva in modo evidente una notevole riduzione delle dimensioni cellulari (fig. 3-2 c, c<sub>1</sub>) pari al 60% e al 71% in AC nel mesocarpo esterno (EM) e nel mesocarpo interno (IM) rispettivamente ( $P < 0.05$  *one-way ANOVA* tabella 3-1).

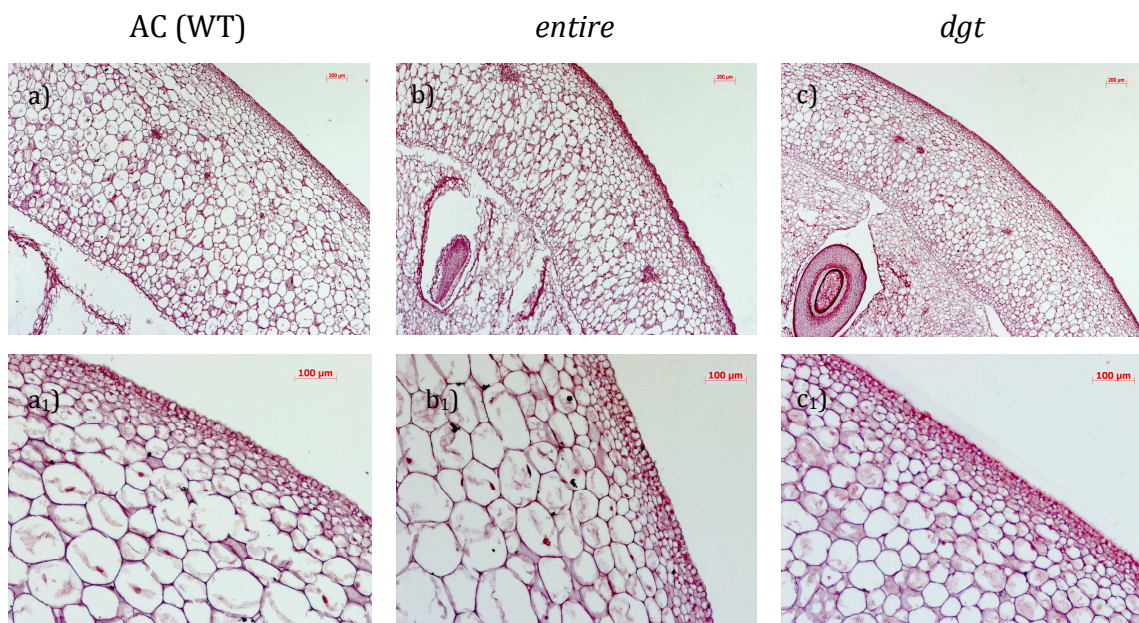


Figura 3-2 Fotografie al microscopio ottico di sezioni trasversali del pericarpo di frutti impollinati e raccolti a 10 DAP. Le foto (a), (b) e (c) sono state scattate a un ingrandimento di 2.5x mentre le foto (a<sub>1</sub>), (b<sub>1</sub>) e (c<sub>1</sub>) rappresentano degli ingrandimenti a 10x.

Tabella 3-1 Analisi di alcuni parametri morfologici effettuati sul pericarpo di frutti al decimo giorno dall'impollinazione. Ad ogni colonna, valori contrassegnati con lettere diverse indicano differenze statistiche ( $P < 0.05$ , *one-way ANOVA* Newman-Keuls test).

genotipo	Spessore (μm)	n° di strati di cellule	Area cellulare	
			EM (μm <sup>2</sup> )	IM (μm <sup>2</sup> )
AC (WT)	1988 ±79 a	27.3 ±0.8 a	5376 ±544 a	13633 ±1605 a
<i>e</i>	1544 ±67 c	24.7 ±0.7 b	4469 ±186 a	12188 ±2275 a
<i>dgt</i>	1113 ±31 b	27.6 ±0.8 a	2159 ±287 b	3911 ±339 b

### Regolazione dell'espressione del gene *LeEXP2* nei frutti impollinati

Il gene *LeEXP2* codifica per un'espansina coinvolta nell'espansione delle cellule durante le prime fasi di sviluppo del frutto (Catalá et al., 2000). L'azione delle espansine si esplica per effetto dell'indebolimento dei legami a idrogeno tra le molecole dei glicani che tengono insieme le microfibrille di cellulosa della parete cellulare (Cosgrove, 2000). Il grafico in figura 3-3 riporta i livelli di espressione nei frutti di AC, *entire* e *dgt*. In tutti e tre i genotipi si assiste ad un andamento apparentemente bimodale in cui è presente un picco prima dell'impollinazione e uno dopo sei giorni dall'impollinazione. Sebbene in *dgt* si osservi un andamento simile a quello descritto, i livelli di espressione a 6 e 8 DAP risultano significativamente più bassi rispetto ad AC. In *entire* il livello di espressione riproduce quello di AC fatta eccezione per una minore espressione al tempo 10 DAP.

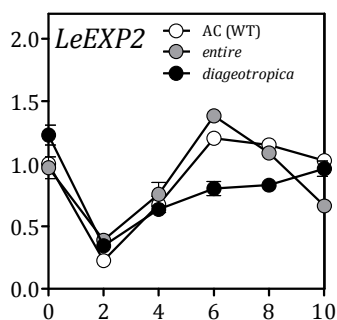


Figura 3-3 Profilo di espressione del gene *LeEXP2* in frutto di pomodoro in AC (WT), *entire* e *diageotropica* a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 di AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

### *Effetto delle mutazioni sulla ploidia nei frutti impollinati*

In pomodoro, lo sviluppo del pericarpo e del tessuto locale è associato a fenomeni di endoreduplicazione delle cellule con conseguente progressivo aumento della ploidia (Joubès et al., 1999; Cheniclet et al., 2005, Gonzalez et al., 2007). Per questa ragione alle indagini di tipo anatomico, sono state affiancate analisi volte a quantificare il livello di ploidia nei tessuti dei frutti impollinati.

Al fine di attribuire al livello di fluorescenza dei nuclei il giusto grado di ploidia, è stato analizzato un tessuto di pomodoro in cui fosse certa la presenza di sole cellule diploidi a contenuto di DNA pari a 2C. In figura 3-4, sono riportati gli istogrammi relativi all'intensità di fluorescenza dei nuclei isolati da ipocotile eziolato di pomodoro (cv. Ailsa Craig). Il primo picco è stato attribuito al valore 2C corrispondente ai nuclei in fase G<sub>1</sub> e il secondo picco al valore 4C, relativo alla popolazione di nuclei in fase G<sub>2</sub> (Doležel et al., 2007).

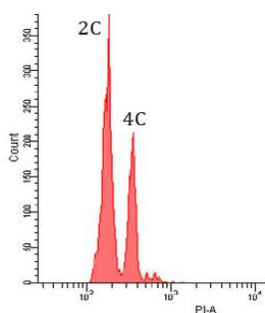


Figura 3-4 Analisi Citofluorimetrica su ipocotili eziolati di pomodoro di AC.

Il contenuto di DNA dei nuclei è stato analizzato nel pericarpo e nel tessuto locale di frutti impollinati di *entire* e *dgt* raccolti a 10 giorni (fig. 3-5).

In AC, sebbene non sia apprezzabile una differenza sostanziale di MCV (fig. 3-6) tra il pericarpo e il tessuto locale, il profilo della ploidia nei due tessuti è risultato molto diverso. Nel pericarpo la distribuzione del contenuto di DNA dei nuclei è risultata eterogenea con un valore C dei nuclei che andava da 2 a 16 (fig. 3-5 a). Diversamente, nel tessuto locale, sebbene non fosse riscontrata la presenza di livelli di DNA corrispondenti a 16C, l'abbondanza relativa del picco 8C risultava

significativamente più alta, ca. il 14% nel pericarpo e ca. il 25% nel tessuto locale (fig. 3-5 a<sub>1</sub>).

In *entire* il grado di endoreduplicazione dei nuclei nel pericarpo è apparso sostanzialmente identico a quello di AC con un valore medio di C (MCV) molto simile (fig. 3-5b e fig. 3-6). Anche per quanto riguarda il tessuto locale, non si osservano sostanziali differenze con AC (fig. 3-5b<sub>1</sub>).

Nel caso del mutante *dgt*, è emerso chiaramente che il livello di endoreduplicazioni sia nel pericarpo che nel tessuto locale dei frutti impollinati è significativamente minore rispetto al AC (fig. 3-5c, c<sub>1</sub>). In particolare, nel pericarpo del mutante, è stata riscontrata un'abbondanza maggiore dei nuclei con valore 2C (65% contro il 40% in AC) oltre a una ridotta numero di nuclei di 8C (5% contro 14%) e all'assenza di nuclei 16C. (fig. 3-5 c). Complessivamente l'effetto della mutazione *dgt* sul contenuto di DNA dei frutti impollinati ha determinato un più basso valore C medio nelle cellule del pericarpo, pari a 3.1 contro 4.5 nel pericarpo di AC, e nel tessuto locale, 3.7 contro 4.4 in AC (fig. 3-6).

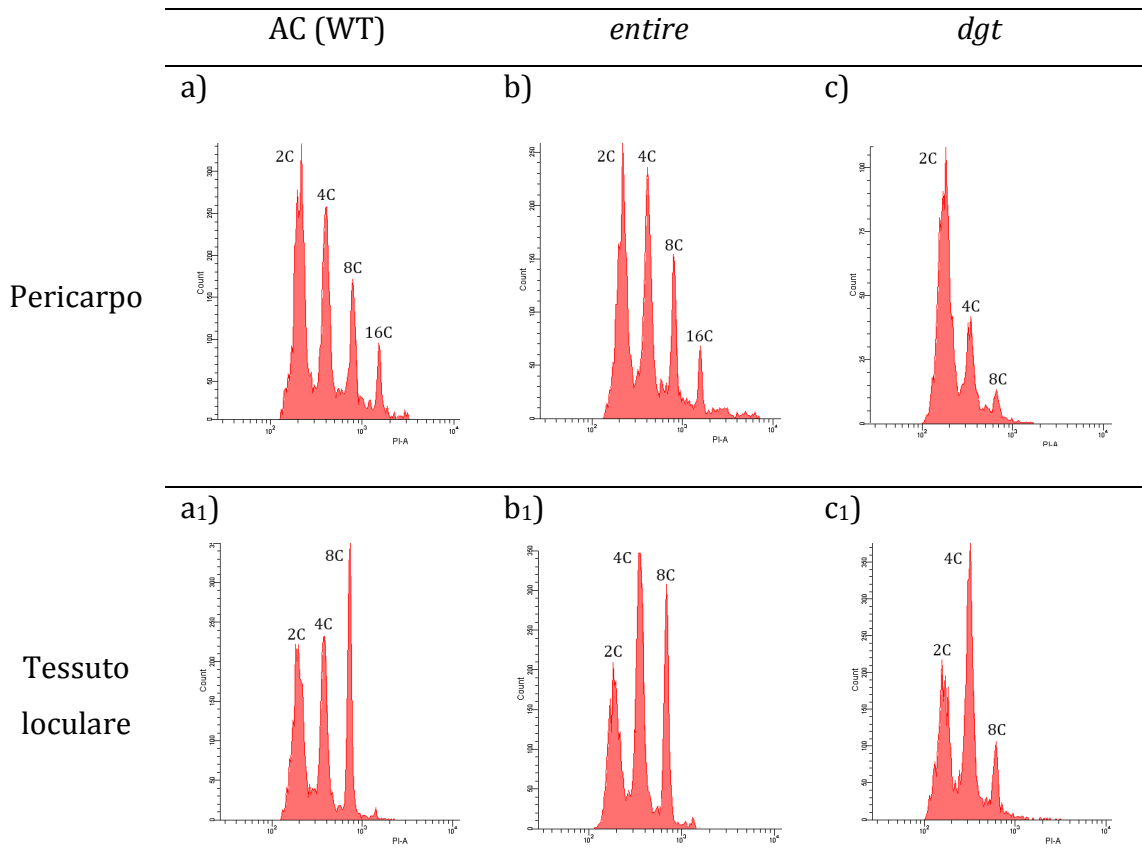


Figura 3-5 Distribuzione del contenuto di DNA nei nuclei isolati dal pericarpo e dal tessuto loculare di frutti impollinati e raccolti dopo 10 giorni.

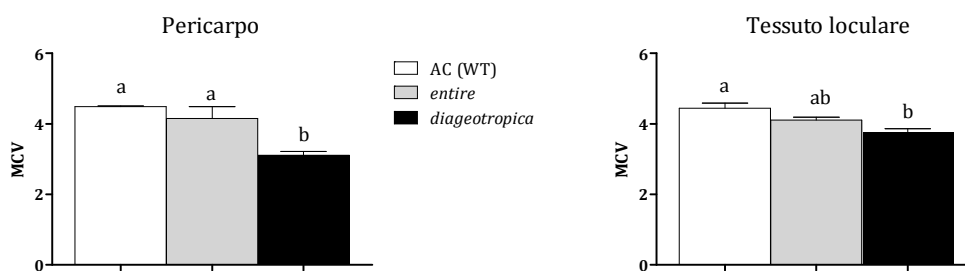


Figura 3-6 Grafici relativi al valore medio C (MCV, *Mean C Value*) misurato nel pericarpo e nel tessuto loculare di frutti impollinati di AC, *entire* e *diageotropica*. Ogni valore corrisponde alla media di 2 o tre repliche costituite da due o tre distinti un pool di 5 frutti. Lettere diverse indicano differenze statistiche ( $P < 0.05$ , *one-way ANOVA Newman-Keuls test*).

### Sviluppo partenocarpico dei frutti

A differenza del mutante *dgt*, in *entire* è stato possibile osservare che la crescita e sviluppo dei frutti avveniva in modo spontaneo anche in assenza dello stimolo derivante dall'impollinazione. Fiori emasculati e non impollinati del mutante *entire*, infatti, esibivano nel 10-20% dei casi uno sviluppo partenocarpico. Nel diagramma in figura 3-7 è riportata la distribuzione percentuale dei pesi dei frutti raccolti dopo 8 giorni dall'emasculazione in AC e in *entire*. Mentre in AC la totalità degli ovari non si era sviluppata e aveva un peso compreso fra 0.005 e 0.01 grammi, in *entire* erano presenti frutti, sebbene in percentuale variabile, il cui peso risultava da 3 a quasi 30 volte superiore.

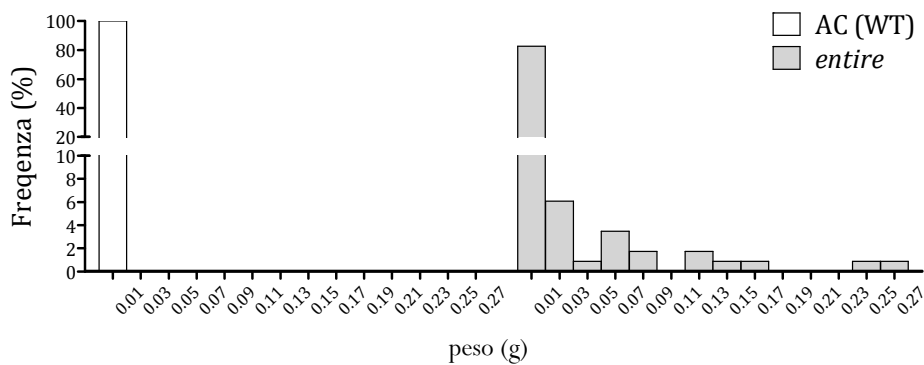


Figura 3-7 Distribuzione della popolazione dei ovari/frutti di AC e di *entire* raccolti dopo 8 giorni dall'emasculazione e suddivise in categorie di peso da 0 a 0.27g

I frutti partenocarpici di *entire* sviluppano in modo simile a un frutto impollinato con la sola eccezione della mancanza dei semi all'interno e per il peso inferiore dei frutti maturi (38.5 g nel partenocarpico contro 59.5g ( $P < 0.05$  t-Test) per i frutti impollinati) (fig. 3-8).

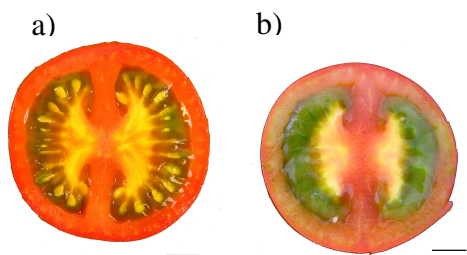


Figura 3-8 Frutto impollinato (a) e frutto partenocarpico (b) in piena maturazione del mutante *entire*. La barra indica 1 cm.

E' interessante notare, inoltre, che la crescita partenocarpica dei frutti di *entire* appariva esaltata nel caso

in cui il numero dei fiori per palco fosse ridotto ad un singolo fiore. In queste condizioni la percentuale di frutti che sviluppavano anche in assenza di impollinazione raggiungeva il 70-80%.

## Effetto delle mutazioni *entire* e *dgt* sulla risposta all'applicazione di auxina e di gibberelline

### Effetto di auxina e gibberelline sull'allungamento dell'ipocotile

Con finalità del tutto preliminari, sono stati allestiti biosaggi volti a stabilire la diversa risposta delle plantule dei vari genotipi a dosi diverse di auxina e di gibberelline. Come è noto l'auxina è in grado di promuovere rapidamente la distensione delle cellule di sezioni di ipocotili (Brummel and Hall, 1987) mentre le gibberelline promuovono l'allungamento dell'ipocotile secondo una relazione dose risposta (Frankland and Wareing, 1960).

Sebbene non sia stata osservata per *entire* alcuna differenza in termini di allungamento dell'ipocotile in risposta sia all'auxina sia alla GA<sub>3</sub>, la risposta ad entrambi gli ormoni da parte di ipocotili *dgt* risultava significativamente ridotta (fig. 3-9 a,b).

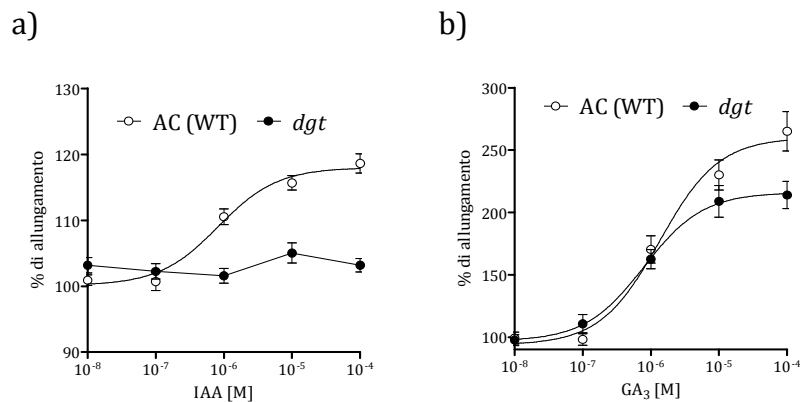


Figura 3-9 Curve dose-risposta dell'allungamento di sezioni di ipocotili di AC e *diageotropica* in presenza di concentrazioni crescenti di acido 3-indolacetico (a) e di ipocotili di plantule cresciute su mezzi contenenti dosi diverse di GA<sub>3</sub> (b). I dati sono riportati come percentuale di allungamento rispetto ai controlli in assenza di ormoni. la barra di errore rappresenta la media  $\pm$  SEM di almeno 20 ipocotili per (a) e di almeno 6 plantule nel caso di (b).

*Effetto di auxina e gibberelline sulla crescita dei frutti*

Sebbene in modo diverso, è noto che sia l'auxina che le gibberelline sono in grado di promuovere la crescita e sviluppo del frutto (Koshioka et al., 1994; Serrani et al., 2007).

Sulla base di alcuni trattamenti con auxina sintetica (4-CPA acido 4-clorofenossiacetico), acido gibberellico (GA<sub>3</sub>) e con un inibitore della biosintesi delle gibberelline (LAB 198999 3,5-diosso-4-butilirril-cicloesano), è stata valutata la diversa risposta in termini di crescita e sviluppo dei frutti dei due mutanti. Non è chiaro, infatti, il modo in cui alterazioni a livello della via di trasduzione del segnale auxinico presenti in *entire* e *dgt* influenzino uno stimolo ormonale esogeno per lo sviluppo del frutto.

La tabella 3-2 riporta tutti i dati (peso e diametro) relativi a tutti i trattamenti eseguiti.

Tabella 3-2 Effetto delle applicazioni di 4-CPA, GA<sub>3</sub>, e LAB 198999 sulla crescita (peso e diametro) degli ovari emasculati e trattati dei mutanti *entire* e *diageotropica*. I valori indicano la media ± SEM di 25-30 frutti.

Trattamento	AC (WT)		<i>entire</i>		<i>dgt</i>	
	Diametro (cm)	Peso (g)	Diametro (cm)	Peso (g)	Diametro (cm)	Peso (g)
mock	0.25 ± 0.005	0.01 ± 0.003	0.85 ± 0.082	0.54 ± 0.17	0.39 ± 0.03	0.04 ± 0.007
4-CPA 20ng	0.27 ± 0.004	0.01 ± 0.001	1.45 ± 0.05	1.61 ± 0.16	—	—
4-CPA 100ng	1.39 ± 0.07	1.35 ± 0.14	1.75 ± 0.05	2.51 ± 0.22	0.56 ± 0.06	0.18 ± 0.04
4-CPA+LAB	0.66 ± 0.05	0.19 ± 0.03	1.59 ± 0.09	1.97 ± 0.26	—	—
Impollinaz.+mock	1.23 ± 0.06	0.95 ± 0.10	1.10 ± 0.05	0.75 ± 0.08	1.13 ± 0.07	0.78 ± 0.11
Impollinaz.+LAB	0.84 ± 0.07	0.39 ± 0.07	0.83 ± 0.07	0.49 ± 0.09	1.02 ± 0.05	0.57 ± 0.07
GA <sub>3</sub>	1.30 ± 0.05	1.12 ± 0.11	1.72 ± 0.04	2.50 ± 0.18	1.15 ± 0.03	0.75 ± 0.05
4-CPA(100ng) + GA <sub>3</sub> (2µg)	1.72 ± 0.04	2.40 ± 0.15	2.19 ± 0.04	4.56 ± 0.29	1.43 ± 0.05	1.65 ± 0.13
4-CPA(100ng) + GA <sub>3</sub> (4µg)	1.64 ± 0.06	2.16 ± 0.24	1.98 ± 0.05	4.21 ± 0.24	1.37 ± 0.04	1.35 ± 0.11
4-CPA(200ng) + GA <sub>3</sub> (2µg)	1.93 ± 0.04	3.36 ± 0.24	1.89 ± 0.05	3.48 ± 0.37	1.50 ± 0.04	1.76 ± 0.14

L'applicazione di 4-CPA in concentrazione di 100ng ovario<sup>-1</sup>, come atteso, ha determinato la crescita dei frutti di AC. Nel mutante *entire*, sebbene lo sviluppo del frutto sia avvenuto parzialmente anche in assenza di alcun trattamento (mock) in virtù del carattere partenocarpico del genotipo, in seguito al trattamento auxinico,

la crescita è stata quasi due volte superiore in termini di peso e di circa il 26% in più come dimensioni del frutto rispetto ad AC (fig. 3-10a). Inoltre, va fatto notare che, sebbene in misura minore rispetto al trattamento 100ng ovario<sup>-1</sup>, è stata osservata in *entire* una risposta al trattamento anche alla dose di 20ng ovario<sup>-1</sup> a cui AC è risultato insensibile (tabella 3-2).

Diversamente, in *dgt*, il trattamento con auxina ha prodotto un incremento di peso e di diametro dei frutticini notevolmente ridotto nell'ordine di circa 7 e 2.5 volte in meno rispetto ad AC (fig. 3-10a).

A seguito del trattamento con LAB 198999, l'inibitore della biosintesi delle gibberelline, gli ovari impollinati di tutti i genotipi risultavano parzialmente arrestati nella crescita. Mentre per AC l'inibitore ha determinato una diminuzione del peso dei frutti pari a circa il 60%, per *entire* e per *dgt* l'effetto è stato di minore entità e pari a circa il 35% e il 27% rispettivamente (tabella 3-2).

Anche il trattamento con GA<sub>3</sub> ha determinato uno stimolo che ha portato alla crescita degli ovari in AC, *entire* ed in *dgt* (tabella 3-2; fig. 3-10b). Sebbene il peso e il diametro dei frutti di AC ed *entire* sia risultato molto simile a quello ottenuto in seguito all'applicazione di 4-CPA 100ng ovario<sup>-1</sup>, l'efficienza dello stimolo è da considerarsi diversa dal momento che del trattamento con gibberelline è stato necessario applicare 2μg di GA<sub>3</sub> per ovario (ca. 5.8nmoli) mentre per l'acido 4-clorofenossiacetico sono stati sufficienti 100ng per ovario (ca. 0.53nmoli). In *dgt* l'applicazione di gibberellina ha prodotto una crescita minore di circa il 33% (in peso) dei frutti di AC.

Il trattamento combinato con auxina e gibberellina ha portato in AC ed in *entire* a una crescita ponderale doppia rispetto al trattamento con la sola GA<sub>3</sub> (fig. 3-10b, c). Merita attenzione il fatto che, il trattamento con 4-CPA+GA<sub>3</sub>, anche i frutti di *dgt* ha determinato un aumento ponderale doppio rispetto al solo trattamento con GA<sub>3</sub> (fig. 3-10c).

L'applicazione simultanea dei due ormoni ma con una dose doppia di GA<sub>3</sub> (4μg) non è stata caratterizzata da alcuna variazione né di peso né di dimensioni dei frutti nei mutanti e in AC rispetto al trattamento 4-CPA 100ng ovario<sup>-1</sup> e GA<sub>3</sub> 2μg ovario<sup>-1</sup>. Tuttavia, quando è stata raddoppiata la concentrazione di 4-CPA portandola a 200ng ovario<sup>-1</sup> ma mantenendo costante quella della GA<sub>3</sub> (2μg), è

stato ravvisato un incremento di peso significativo in AC, nessun cambiamento per *dgt* e una diminuzione per *entire* (tabella 3-2).

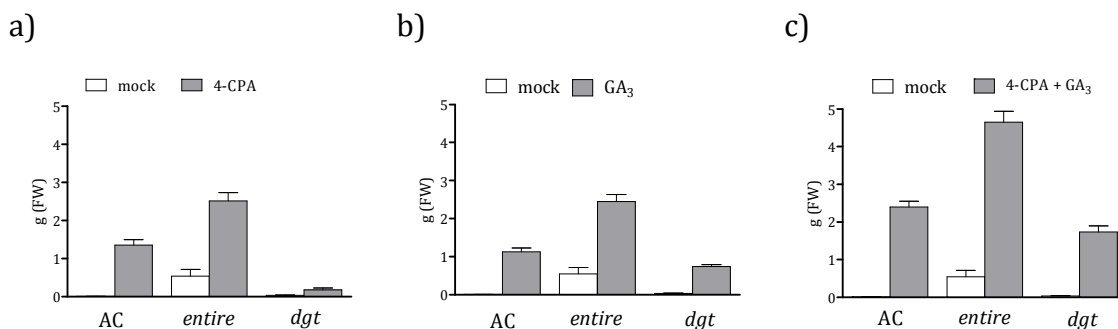


Figura 3-10 Istogrammi relativi al peso dei frutti raccolti a 10 giorni dal trattamento con 4-CPA (a), GA<sub>3</sub> (b) e 4-CPA + GA<sub>3</sub> (c). I valori rappresentano la media ± SEM di 20-30 frutti.

#### *Effetto di auxina e gibberelline sulla morfologia dei frutti*

I diversi parametri morfologici, riportati in tabella 3-3, sono stati misurati su sezioni trasversali di frutto trattato con 4-CPA e con GA<sub>3</sub> (fig. 3-11).

In seguito al trattamento auxinico, i frutti del mutante *entire* mostravano uno sviluppo del pericarpo superiore in termini di spessore e numero di strati cellulari in confronto ad AC, ma nessun effetto significativo per quanto riguarda le dimensioni delle cellule (fig. 3-11 a, b e tab. 3-3)

La ridotta crescita dei frutti di *dgt* in risposta all'auxina ha coinvolto diversi aspetti dell'anatomia dei frutti, da un ridotto numero di cellule a una minore espansione, ad un mancato sviluppo del tessuto locale. Infatti le cellule del mesocarpo esterno e interno avevano una dimensione pari a circa la metà rispetto al background genetico AC (fig. 3-11 a, c e tab. 3-3).

Diversamente al trattamento con 4-CPA, l'applicazione della GA<sub>3</sub> ha determinato alterazioni sostanziali nell'organizzazione dei tessuti del frutto nei diversi genotipi.

L'effetto della gibberellina ha infatti determinato in AC e in *dgt* la formazione di cellule prevalentemente di forma ellittica di grandi dimensioni, determinando così un aumento dello spessore del pericarpo. Sempre in AC e in *dgt*, rispetto al trattamento con 4-CPA l'effetto della GA<sub>3</sub> ha provocato una significativa riduzione del numero di strati cellulari.

Una delle differenze più macroscopiche tra il mutante *entire* e in AC riguarda la formazione del tessuto locale. Come si può vedere nella foto (e) in fig. 3-11 *entire* è in grado di sviluppare placenta e pseudo/semi a seguito del trattamento con gibberellina mentre in AC (e in *dgt*) lo stimolo ha interessato quasi esclusivamente la crescita del pericarpo (fig. 3-11d, f).

Dopo 30 giorni dal trattamento con gibberellina nei frutti di *entire* il tessuto locale appare completo dotato di tessuto placentare e di parenchima gelificato mentre risulta estremamente ridotto in AC fino a mancare del tutto in *dgt* (fig. 3-12). Il trattamento, inoltre ha portato *entire* ad avere cellule di minori dimensioni ma un numero maggiore di strati tra l'epidermide e l'endocarpo rispetto ad AC (tab. 3-3).

Rispetto al trattamento con la solo 4-CPA, la combinazione con GA<sub>3</sub> ha portato un aumento degli strati cellulari in AC e in *dgt* e una diminuzione in *entire* (tab. 3-3). Sebbene in *dgt*, lo spessore e le dimensioni delle cellule del mesocarpo sono risultate notevolmente inferiori in confronto ad AC (tab. 3-3), è interessante il fatto che, mentre applicazioni di solo 4-CPA o GA<sub>3</sub> non hanno determinato lo sviluppo del tessuto locale, in presenza dei due ormoni contemporaneamente si forma in modo del tutto simile ad AC (fig. 3-11i).

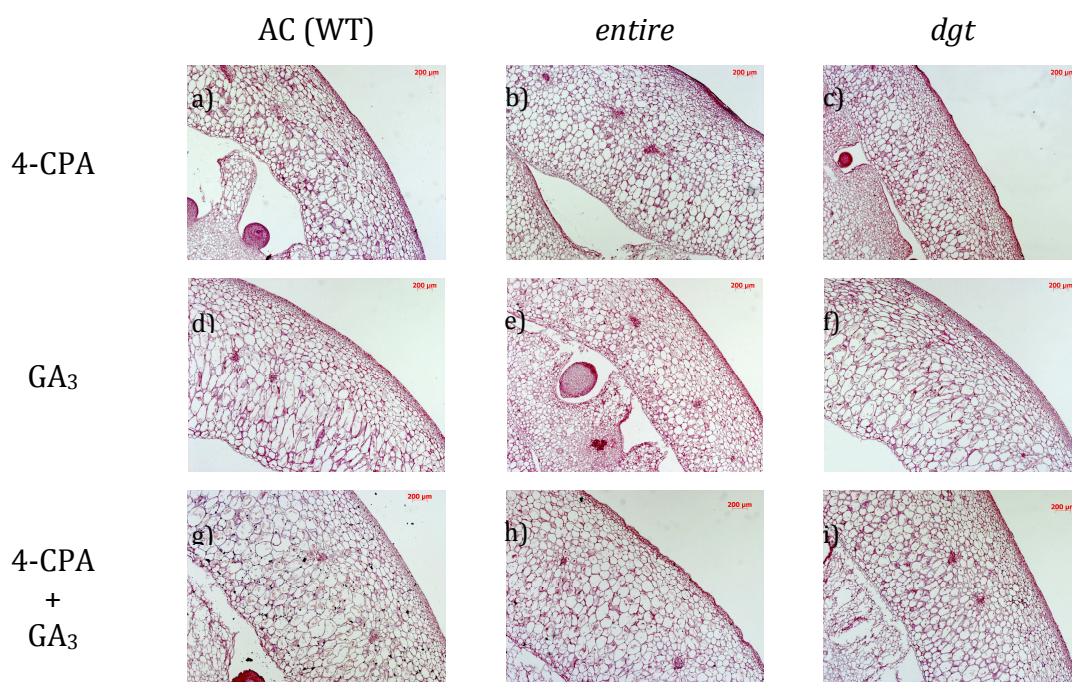


Figura 3-11 Fotografie al microscopio ottico di sezioni trasversali del pericarpo di frutti di pomodoro della cv. AC e dei mutanti *entire* e *diageotropica* trattati con 4-CPA e GA<sub>3</sub> a 10 giorni dal trattamento.

Tabella 3-3 Analisi di alcuni parametri morfologici effettuati sul pericarpo di frutti al decimo giorno dal trattamento con 4-CPA e GA<sub>3</sub>. Ad ogni colonna per ciascun trattamento i valori contrassegnati con lettere diverse indicano differenze statistiche ( $P < 0.05$ , *one-way ANOVA Newman-Keuls test*).

Trattamento	genotipo	Spessore ( $\mu\text{m}$ )	n° di strati di cellule	Area cellulare	
				EM ( $\mu\text{m}^2$ )	IM ( $\mu\text{m}^2$ )
4-CPA	AC (WT)	1501 $\pm$ 48 b	27.9 $\pm$ 0.5 b	3893 $\pm$ 187 b	11750 $\pm$ 1419 b
	<i>entire</i>	2115 $\pm$ 108 c	32.2 $\pm$ 1.4 c	4763 $\pm$ 469 b	10467 $\pm$ 1003 b
	<i>dgt</i>	1147 $\pm$ 18 a	25.5 $\pm$ 0.3 a	1976 $\pm$ 264 a	6775 $\pm$ 208 a
GA <sub>3</sub>	AC (WT)	2127 $\pm$ 117 b	25.1 $\pm$ 0.2 a	5564 $\pm$ 649 b	24027 $\pm$ 2046 b
	<i>entire</i>	1698 $\pm$ 109 c	30.4 $\pm$ 1.8 b	3318 $\pm$ 135 a	9250 $\pm$ 1093 a
	<i>dgt</i>	2000 $\pm$ 70 b	25.4 $\pm$ 1.1 a	6103 $\pm$ 578 b	20235 $\pm$ 1237 b
4-CPA+GA <sub>3</sub>	AC (WT)	2238 $\pm$ 66 b	27.3 $\pm$ 1.2 a	6589 $\pm$ 235 b	24027 $\pm$ 2046 b
	<i>entire</i>	2279 $\pm$ 91 b	26.9 $\pm$ 0.8 a	6618 $\pm$ 135 b	25250 $\pm$ 1290 b
	<i>dgt</i>	1670 $\pm$ 74 a	27.4 $\pm$ 0.9 a	4057 $\pm$ 785 a	11922 $\pm$ 1220 a

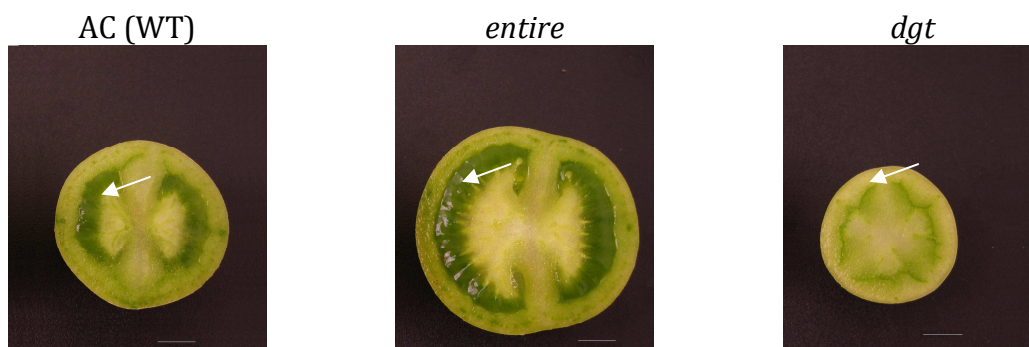


Figura 3-12 Effetto del trattamento con gibberellina su frutti di AC, *e*, *dgt* raccolti dopo 30 giorni dal trattamento. Si noti il diverso grado di sviluppo del parenchima all'interno della cavità loculare indicato dalle frecce bianche. La barra indica 1 cm.

#### *Effetto di auxina e gibberelline sulla ploidia nei frutti.*

L'effetto del trattamento con auxina sul pattern di ploidia delle cellule del pericarpo e del tessuto loculare di AC e del mutante *entire* è riportato in fig. 3-13. La ridotta crescita dei frutti di *dgt* in risposta al trattamento con auxina, non ha reso possibile analizzare efficacemente la quantità di DNA nucleare a causa dell'ossidazione dei fenoli liberati nell'estratto.

Gli istogrammi presentati in figg. 3-13a, b e i valori di MCV in tab. 3-4, mostrano che a seguito del trattamento auxinico, il valore C dei nuclei delle cellule del pericarpo del mutante *entire* non subisce alcuna variazione rispetto ad AC. Per entrambi i genotipi infatti sono evidenti i picchi relativi a 2, 4, 8, e 16C con percentuali circa del 49, 29, 9 e 3%.

Diverso è il caso per il tessuto loculare. Il valore medio di ploidia in AC risulta essere inferiore rispetto a quello del tessuto loculare di *entire* (tab. 3-4). In AC si assiste infatti ad un netto prevalere della popolazione di nuclei 2C (52% ca.) in *entire* la popolazione di nuclei 2C si riduce al 34% con di nuclei 4C e 8C attorno al 30 e al 26%.

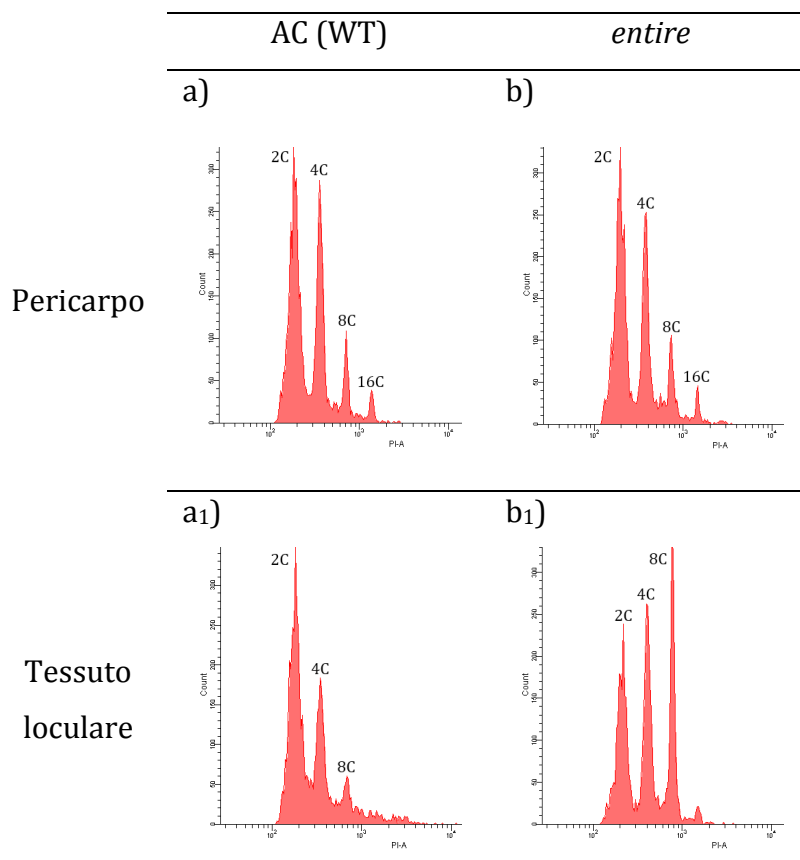


Figura 3-13 Distribuzione del contenuto di DNA nei nuclei isolati dal pericarpo e dal tessuto loculare di frutti trattati con 4-CPA e raccolti dopo 10 giorni.

L'applicazione di  $GA_3$  sugli ovari ha determinato un forte stimolo verso l'endoreduplicazione delle cellule del pericarpo di AC. Risulta infatti evidente la presenza della popolazione di nuclei 32C in percentuale del 3-4% (fig. 3-14a) assente nel trattamento con auxina. Rispetto al pericarpo, nel tessuto loculare, il grado di ploidia è apparso molto inferiore, con nuclei fino ad un massimo di 8C. Per quanto riguarda *entire*, l'effetto della gibberellina non ha alterato in modo evidente la popolazione dei nuclei poliploidi come in AC. Il trattamento con l'ormone ha infatti prodotto nel pericarpo un pattern di ploidia da 2 fino a 16C con rapporti analoghi a quelli ottenuti per il 4-CPA (fig. 3-14b). Nel tessuto loculare, il livello di ploidia non superava un massimo di 8C ma con un valore medio di C superiore rispetto ad AC (tab. 3-4). L'abbondanza relativa dei diversi nuclei nel tessuto loculare appare infatti differente rispetto ad AC e pari a ca. il 32% (2C) 30% (4C) e 24% (8C) per il mutante, e di ca. il 50% (2C) 29% (4C) 11% (8C) per AC.

In *dgt* l'effetto della GA<sub>3</sub> sul pericarpo ha determinato la formazione di cellule poliploidi con un contenuto massimo di DNA nucleare di 16C (fig. 3-14c) significativamente inferiore rispetto ad AC. Inoltre, la frequenza dei nuclei 2C risultava pari al 48% in *dgt* contro il 35% in AC. L'effetto dell'ormone sul tessuto locale ha prodotto un debole effetto sulle endoreduplicazioni delle cellule, determinando un massimo di 2 endocicli (8C) con frequenze appena superiori al 3% e con un netto prevalere dell'assetto diploide (64%) (fig. 3-14c<sub>1</sub>). Il valore medio di ploidia risulta infatti essere significativamente inferiore rispetto al AC sia nel pericarpo che nel tessuto locale e pari a circa 3.88 e 2.69 rispettivamente (tab. 3-4).

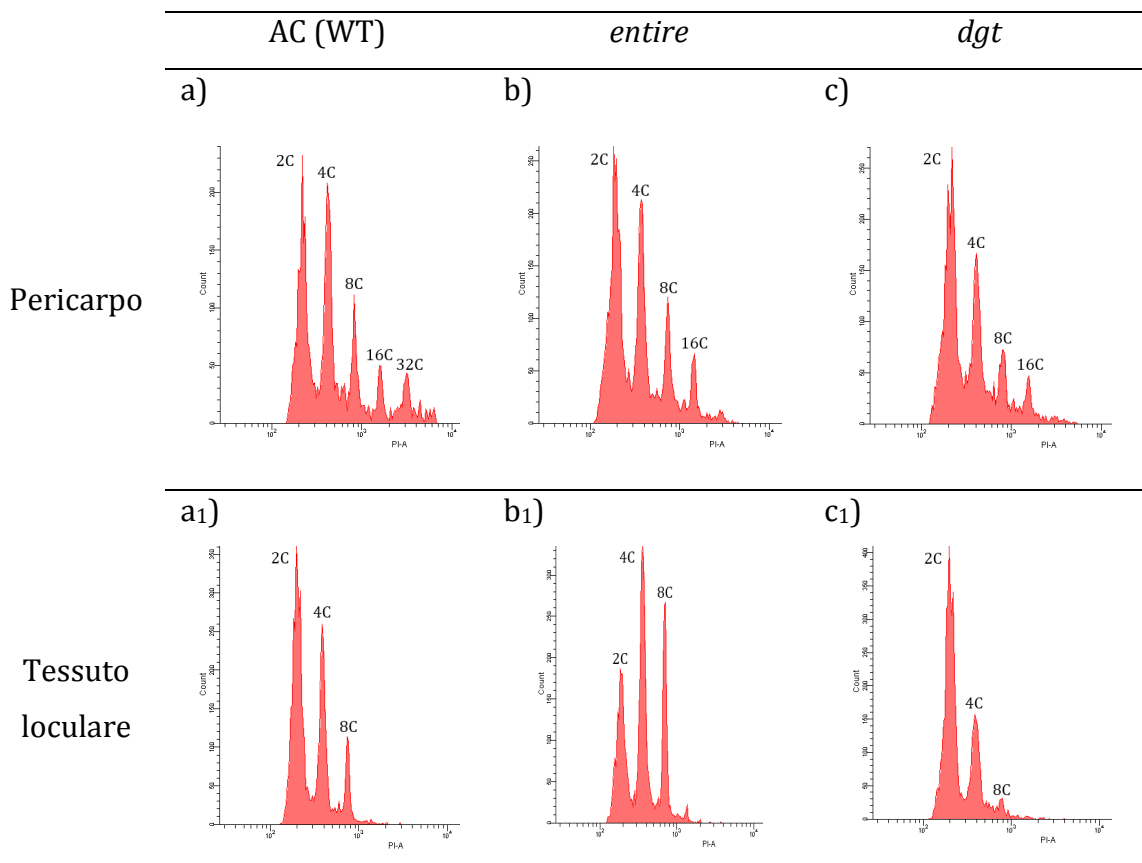


Figura 3-14 Distribuzione del contenuto di DNA nei nuclei isolati dal pericarpo e dal tessuto locale di frutti trattati con GA<sub>3</sub> e raccolti dopo 10 giorni.

In AC la combinazione di 4-CPA e GA<sub>3</sub> ha determinato la scomparsa della popolazione di nuclei 32C dal pericarpo (fig. 3-15), pur non alterando in modo sostanziale il valore di MCV (tab. 3-4). Il tessuto locale tuttavia, non sembra aver subito variazioni di rilievo nel pattern di ploidia delle cellule rispetto ai trattamenti con auxina e gibberelline da sole (fig. 3-15a<sub>1</sub>).

In *entire* sebbene non si osservino particolari effetti sul pericarpo, la combinazione dei due ormoni provoca una significativa riduzione del livello di ploidia nel tessuto locale rispetto al trattamento con solo 4-CPA, causando la scomparsa dei nuclei 16C (fig. 3-15 e tab. 3-4).

Infine, in *diageotropica*, è interessante osservare che a dispetto del solo trattamento con GA<sub>3</sub>, la presenza congiunta di 4-CPA, determina un'esaltazione della ploidizzazione delle cellule del frutto. Infatti, il valore medio di ploidia passa da 3.80 a 4.35 nel pericarpo e da 2.69 a 3.40 nel tessuto locale (tab. 3-4).

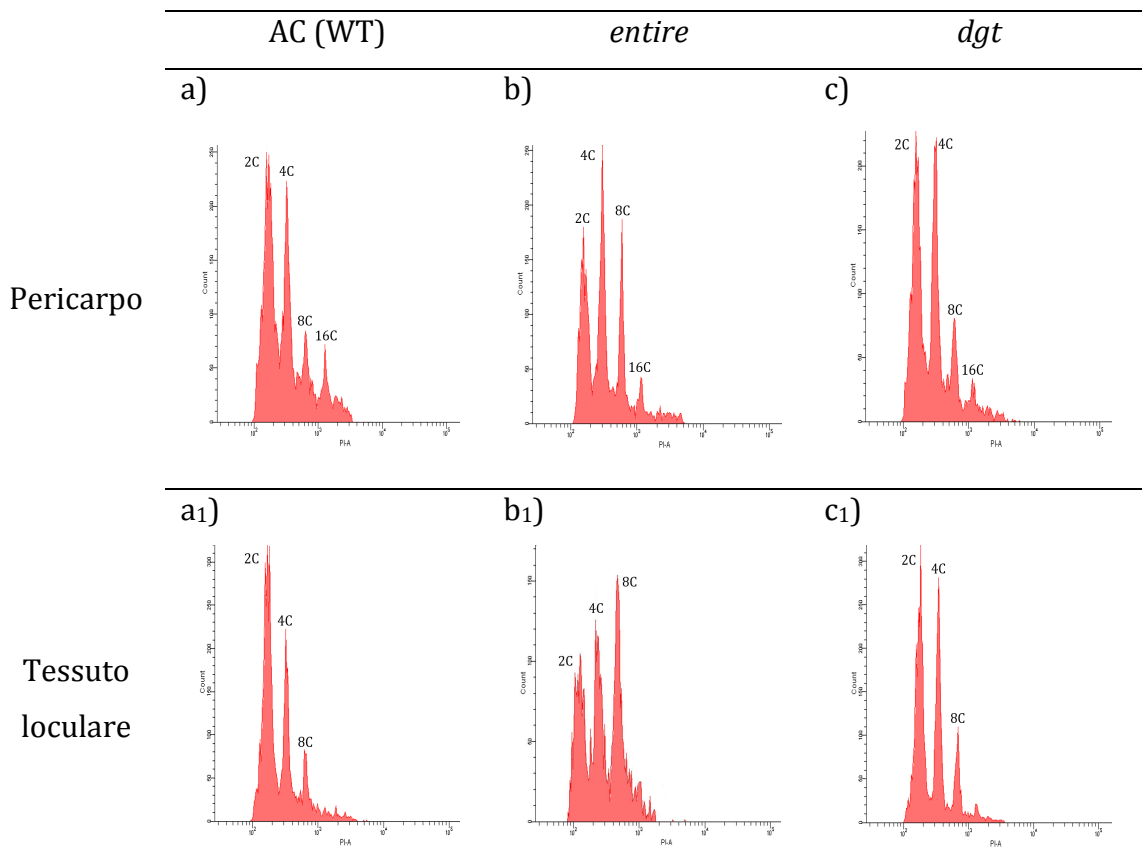


Figura 3-15 Distribuzione del contenuto di DNA nei nuclei isolati dal pericarpo e dal tessuto locale di frutti trattati con 4-CPA+GA<sub>3</sub> e raccolti dopo 10 giorni.

Tabella 3-4 Media del valore C (MCV, *Mean C Value*) dei nuclei isolati dal pericarpo e tessuto locale di frutti di AC, *e*, *dgt*, trattati con 4-CPA, GA<sub>3</sub> e 4-CPA+GA<sub>3</sub>. Ogni valore corrisponde alla media di 2 o tre repliche costituite da due o tre distinti un pool di 5 frutti. Ad ogni colonna per ciascun trattamento, valori contrassegnati con lettere diverse indicano differenze statistiche (P<0.05, *one-way* ANOVA Newman-Keuls test). Nel caso del trattamento con 4-CPA l'analisi statistica è stata effettuata con t-Test e l'asterisco indica che la differenza è significativa.

genotipo	Trattamento					
	4-CPA		GA <sub>3</sub>		4-CPA+GA <sub>3</sub>	
	Peric.	T. loc.	Peric.	T. loc.	Peric.	T. loc.
AC (WT)	3.67 ±0.02	3.19 ±0.10	4.33 ±0.01b	3.45 ±0.17b	4.60 ±0.14a	3.21 ±0.14a
<i>entire</i>	4.15 ±0.15	5.27 ±0.26*	4.66 ±0.09c	4.62 ±0.09c	4.46 ±0.06a	4.60 ±0.01b
<i>dgt</i>	-	-	3.88 ±0.02a	2.69 ±0.03a	4.35 ±0.15a	3.40 ±0.14a

## Regolazione ormonale dello sviluppo dei frutti dei mutanti *entire* e *dgt*

### *Effetto della doppia mutazione gib-1/e sullo sviluppo vegetativo e riproduttivo*

In seguito alla costituzione del doppio mutante *gib-1/e* è stato possibile valutare il ruolo della mutazione del gene *ENTIRE* sullo sviluppo della pianta e sul frutto in una situazione completamente svincolata dalla presenza delle gibberelline endogene.

In virtù della segregazione indipendente in F<sub>2</sub> dei geni *ENTIRE* e *GIB-1* è stato possibile selezionare il doppio mutante *gib-1/e* (frequenza 1/16) sulla base del fenotipo. Infatti, *gib-1/e* riuniva in sé le caratteristiche dei parentali *entire* e *gibberellin deficient-1* cioè incapace di germinare senza l'apporto di gibberelline, provvisto di foglie quasi completamente indivise e di internodi estremamente accorciati (fig. 3-16).

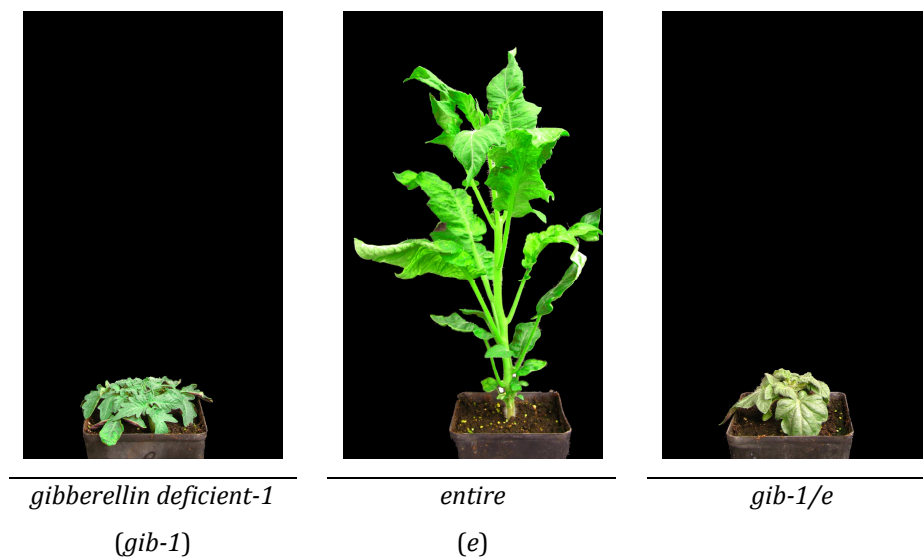


Figura 3-16 Sviluppo vegetativo dei mutanti *gibberellin deficient-1 (gib-1)*, *entire (e)*, e il doppio mutante *gib-1/e* dopo quattro settimane dalla semina. Prima del trapianto i semi di *gib-1* e di *e/gib-1* sono stati fatti germinare su carta da filtro imbibita con acqua e in presenza di GA<sub>4+7</sub> 100µM.

Come il parentale *gib-1*, il doppio mutante rispondeva all'applicazione quotidiana di GA<sub>4+7</sub> che in parte riusciva a ripristinare l'allungamento normale del fusto, la distensione delle foglie e lo sviluppo completo dei fiori. In nessun caso tuttavia, è stato osservato che la mutazione *entire* avesse alterato in modo evidente i processi di allegagione, di crescita e di sviluppo dei frutti quando la funzionalità del gene *GIB-1* risultava mancante (fig. 3-17).



Figura 3-17 Nessuna differenza evidente dal confronto tra i frutti ottenuti dal mutante *gib-1* (a sinistra) e dal doppio mutante *gib-1/e* (a destra). Si noti tuttavia la tipica fusione dei sepali nel frutto di *gib-1/e* tipico carattere associato alla mutazione del gene *ENTIRE*.

#### *Effetto doppia mutazione pro/e sullo sviluppo vegetativo e riproduttivo*

La realizzazione del doppio mutante *procera/entire* (*pro/e*) ha avuto come finalità quella di osservare alcune caratteristiche dello sviluppo del frutto in assenza di impollinazione.

Il mutante *procera* presenta caratteristiche fenotipiche riconducibili a una pianta trattata con GA<sub>3</sub> (Jones, 1987), e la recente caratterizzazione molecolare ha infatti appurato che il gene *PRO* codifica per una proteina DELLA responsabile dell'inibizione del segnale gibberellinico in pomodoro (Jasinski et al., 2008).

Anche in questo caso grazie alla segregazione indipendente in F<sub>2</sub> dei geni *PROCERA* ed *ENTIRE* è stato possibile selezionare il doppio mutante *pro/e* (frequenza 1/16) sulla base del fenotipo. Le piante *pro/e* mantenevano intatti i caratteri dei parentali, vale a dire: portamento fortemente allungato o *slender* (fenotipo *procera*) ed estrema riduzione della complessità fogliare (fenotipo *entire*) (fig. 3-18).

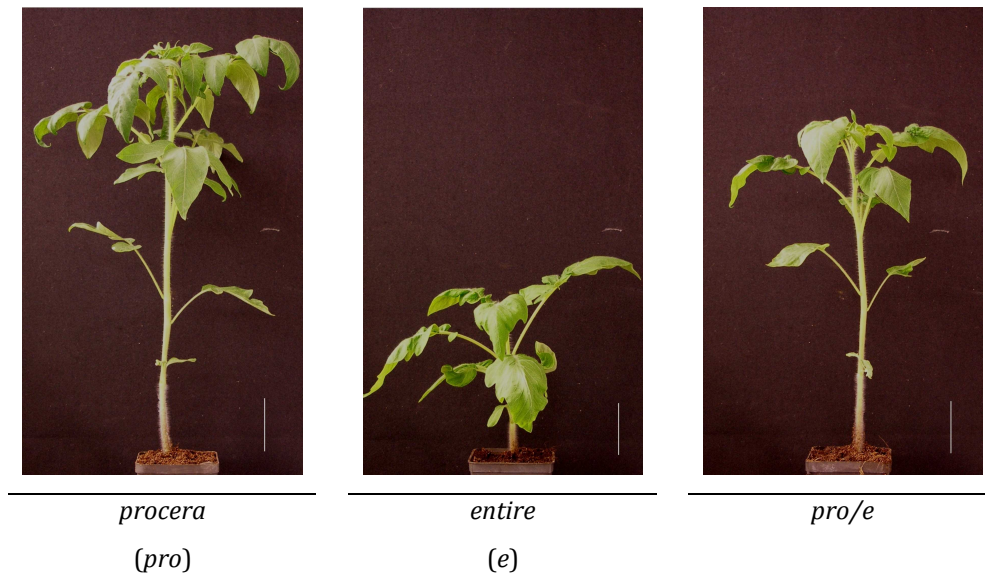


Figura 3-18 Fenotipo delle piante dei mutanti *procera* (*pro*), *entire* e del doppio mutante *pro/e* dopo quattro settimane dalla semina. Del doppio mutante si osservi il portamento allungato del unito allo sviluppo indiviso delle foglie. La barra verticale indica 10 cm.

I frutti del mutante *pro* tendono allo sviluppo partenocarpico in assenza di impollinazione. Tuttavia risultano di piccole dimensioni e dotati di un parenchima locale decisamente ridotto, esattamente come nel caso di un frutto trattato con gibberelline. L'idea di introdurre la mutazione *entire* nel *background* genetico di *procera* ha avuto come finalità quella di verificare se una parziale attivazione del segnale auxinico per effetto della mutazione sul gene *LeIAA9* in *entire* (Zhang et al., 2007), fosse in grado, almeno parzialmente, di generare frutti partenocarpici a sviluppo completo. Effettivamente, i frutti del



Figura 3-19 Frutti partenocarpici in piena maturazione del mutante *procera* (*pro*) e del doppio mutante *pro/e* (foto in alto). Nel doppio mutante, alla maggiore crescita dei frutti, si associa anche un maggior sviluppo del tessuto locale (gel) interno (foto in basso). Le barre di colore bianco negli angoli a sinistra delle due foto indicano 1 cm.

doppio mutante *pro/e*, oltre ad avere dimensioni significativamente superiori rispetto al genitore *pro*, è visibile una columella e un tessuto loculare interno molto più sviluppato (fig. 3-19).

#### *Regolazione dell'espressione dei geni della biosintesi delle GAs durante lo sviluppo dei frutti impollinati di *entire* e *dgt**

Al fine di valutare l'effetto delle mutazioni *entire* e *dgt* sul metabolismo delle gibberelline durante i primi stadi della formazione del frutto, sono state condotte analisi volte a quantificare i livelli di espressione dei principali geni coinvolti nella biosintesi di tali ormoni. In particolare i geni della famiglia delle 20-ossidasi (fig. 3-20) delle GA3 $\beta$ -ossidasi (fig. 3-21) e delle 2 $\beta$ -ossidasi (fig. 3-22).

All'interno della famiglia delle 20-ossidasi (*Sl20ox-1*, *Sl20ox-2* e *Sl20ox-3*) l'espressione dei geni della *20ox-1* e *20ox-3* è risultata superiore rispetto a quella della *20ox-2* sia in AC che nel mutante *entire*. Sebbene sia in AC sia in *entire* i livelli di trascrizione della *20ox-1* e *20ox-3* aumentavano progressivamente fino a 8 giorni, diminuendo poi a 10 DAP, nel mutante si nota una maggiore induzione del gene in corrispondenza di 4, 6 e 8 DAP (fig. 3-20).

Sebbene anche per *dgt* l'espressione della *20ox-1* aumenti gradualmente da 0 a 6 DAP con un trend simile ad AC, a 8 DAP non si assiste alla rapida induzione che è invece evidente in AC. Nel caso della *20ox-3* in, l'espressione è mantenuta bassa a 6 e 8 giorni ma aumenta improvvisamente al decimo giorno. A tutto questo si aggiunge l'assenza di espressione della *20ox-2* nel mutante (fig. 3-20)..

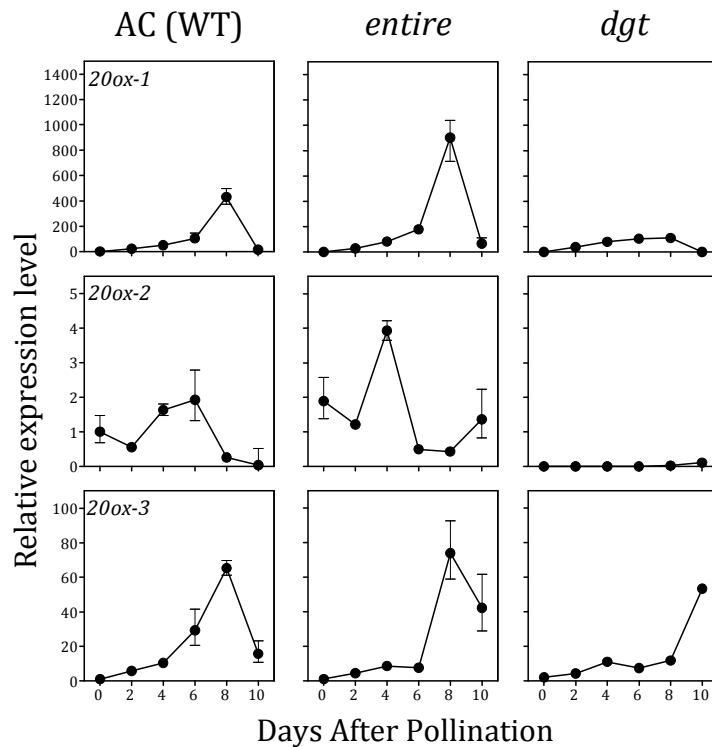


Figura 3-20 Livelli di espressione dei geni appartenenti alla famiglia delle GA 20-ossidasi (*20ox-1*, *20ox-2* e *20ox-3*) in frutti di AC, *entire* e *diageotropica* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 in AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

I livelli di trascrizione dei geni appartenenti alla famiglia delle GA3 $\beta$ -ossidasi (*Sl3ox-1* e *Sl3ox-2*) (fig. 3-21) in AC e in *entire* sono risultati molto bassi e regolati in modo analogo. Infatti, per i geni *3ox-1-2* l'espressione è più alta nei primi due giorni dall'impollinazione e diminuisce agli stadi successivi mantenendosi pressoché costante.

Anche in *dgt* i livelli di trascrizione di entrambi i geni diminuiscono progressivamente con lo sviluppo del frutto. Tuttavia rispetto ad AC, per il gene della *3ox-1* l'espressione è mantenuta più alta fino a 6 DAP (fig. 3-21).

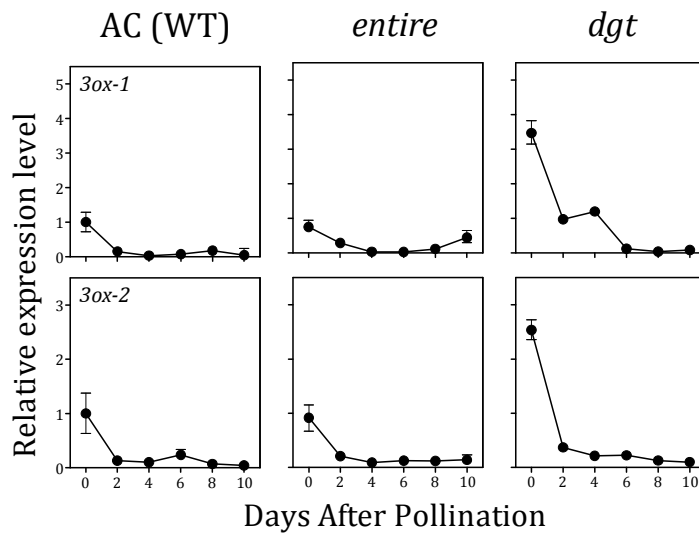


Figura 3-21 Livelli di espressione dei geni appartenenti alla famiglia delle GA3 $\beta$ -ossidasi (*3ox-1* e *3ox-2*) in frutti di AC, *entire* e *diageotropica* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 in AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

Sia in AC che in *entire*, i geni delle 2 $\beta$ -ossidasi (*Sl2ox-1*, *Sl2ox-2*, *Sl2ox-4* e *Sl2ox-5*) mostravano andamenti analoghi nella regolazione dell'espressione durante le fasi di sviluppo dei frutti (fig. 3-22).. I livelli più alti di espressione per la *2ox-1* sono stati registrati nei giorni 2, 4 DAP rispettivamente nel mutante ed in AC. Per entrambi i genotipi, l'induzione del gene della *2ox-5* è avvenuta in modo progressivo seguendo lo sviluppo del frutto, con un picco massimo di espressione a 8 DAP, superiore di oltre 100 volte rispetto al tempo 0. Nessuna variazione significativa è invece stata osservata per l'espressione del gene della *2ox-2* che ha subito poche oscillazioni nel corso dello sviluppo dei frutti (fig. 3-22).

Anche per la *2ox-4* le variazioni di espressione sono risultate piuttosto ridotte e anche in questo caso è visibile un picco a 8 giorni sia in AC che in *entire*.

Per quanto riguarda *dgt*, le maggiori differenze rispetto al AC sono state osservate a carico dei geni della *2ox-4* e della *2ox-5*. In tutti e due i casi è visibile una netta diminuzione di quantità di trascritti prevalentemente nel periodo da 6 a 8 giorni dall'impollinazione (fig. 3-22).

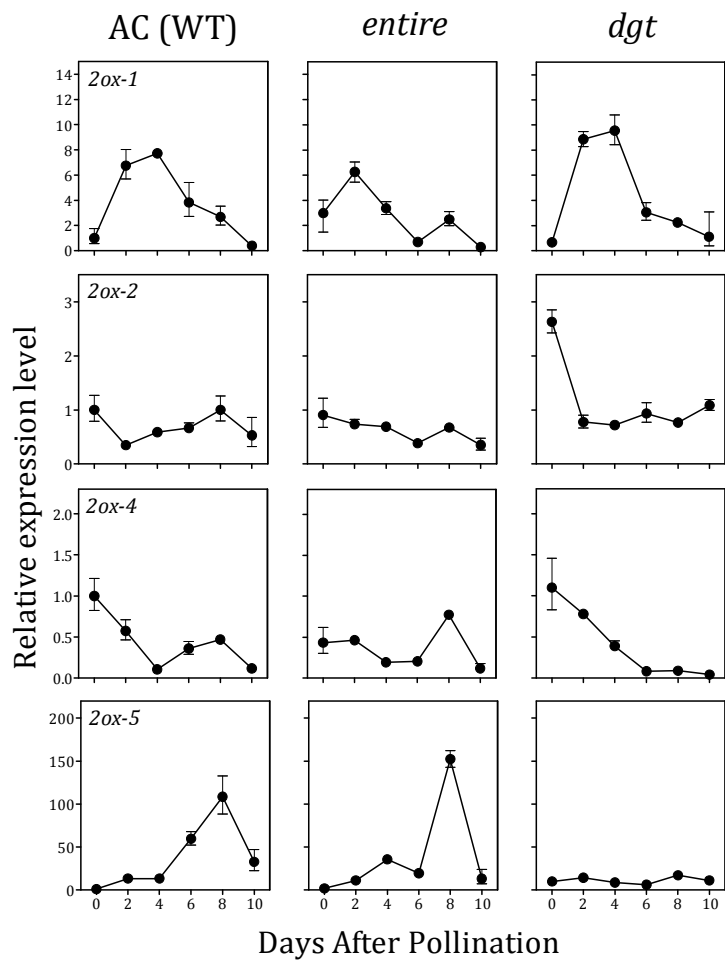


Figura 3-22 Livelli di espressione dei geni appartenenti alla famiglia delle GA 2 $\beta$ -ossidasi (*2ox-1*, *2ox-2*, *2ox-4* e *2ox-5*) in frutti di AC, *entire* (*e*) e *diageotropica* (*dgt*) raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 in AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

*Regolazione del gene GAST1 durante lo sviluppo dei frutti impollinati di entire e dgt*

I geni della famiglia *GAST* (*Gibberellic Acid Stimulated Transcript*) sono noti per essere rapidamente indotti da gibberelline (Aubert et al., 1998; Ben-Nissan and Weiss, 1996; de la Fuente et al. 2006; Zimmermann et al., 2010). Anche in pomodoro il gene *GAST1* è regolato positivamente da  $GA_3$  (Shi et al., 1992).

L'espressione del gene *GAST1* nei frutti rivela un aumento progressivo a partire dal secondo giorno dopo l'impollinazione sia in AC sia nei due mutanti (fig.3-23).

È tuttavia significativo il fatto che da 4 a 8 DAP il gene appare più espresso in *entire* e meno in *dgt*.

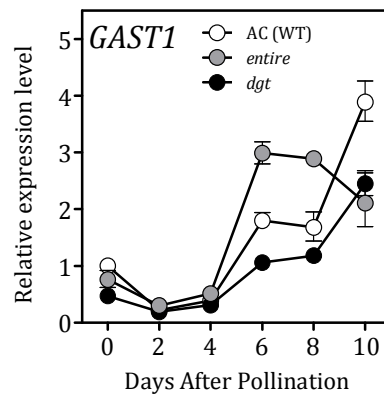


Figura 3-23 Profilo di espressione del gene *GAST1* in frutti di pomodoro in AC (WT), *entire* e *dgt* a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 in AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

*Regolazione dell'espressione dei geni della biosintesi delle GAs durante lo sviluppo partenocarpico dei frutti non impollinati di entire*

Come descritto in precedenza, il mutante *entire* era in grado di sviluppare frutti in modo del tutto svincolato dallo stimolo proveniente dall'impollinazione. Al fine di stabilire se lo sviluppo partenocarpico dei frutti di *entire* fosse almeno in parte attribuibile ad alterazioni dell'espressione dei geni del metabolismo gibberellinico, sono stati analizzati i trascritti dei geni coinvolti nei frutti non impollinati del mutante e confrontati quelli non impollinati di AC (figg. 3-24-25-26).

Mentre nei frutti di AC non impollinati i geni *20ox-1* e *20ox-3* apparivano quasi del tutto inespressi, nel mutante si assiste ad un'attivazione del gene della *20ox-1* già a 2 giorni e con un incremento repentino a 8 e 10 DAE (*Days After Emasculation*). Tuttavia va fatto notare che in *entire* la regolazione di tale gene nei frutti partenocarpici a 8 giorni (fig. 3-25) è risultata inferiore di oltre 7 volte alla condizione dei frutti impollinati (fig. 3-20).

Nei frutti non impollinati sia di AC che di *entire*, l'espressione del gene *3ox-1* risultava regolata negativamente e in modo molto simile a partire dal secondo giorno dall'emasculazione (fig. 3-25). Tuttavia l'espressione del gene da 2 a 8 giorni nei frutti partenocarpici di *entire* (fig. 3-25) era mantenuta sensibilmente più alta rispetto a quella misurata nei frutti impollinati (fig. 3-21). Per quanto riguarda il gene *3ox-2*, non si rilevano differenze sostanziali tra i frutti impollinati (fig. 3-21) e non (fig. 3-25) di entrambi i genotipi.

Tutti i geni appartenenti alla classe delle  $2\beta$ -ossidasi apparivano regolati in modo negativo nei frutti partenocarpici di *entire* a partire dal quarto giorno dall'emasculazione in poi (fig. 3-26). In AC, al contrario si nota un'attivazione prevalentemente dei geni *2ox-2*, *2ox-4* e *2ox-5* a partire da 4 DAE superiore anche a quella osservata nei frutti impollinati (fig. 3-22 e fig. 3-26).

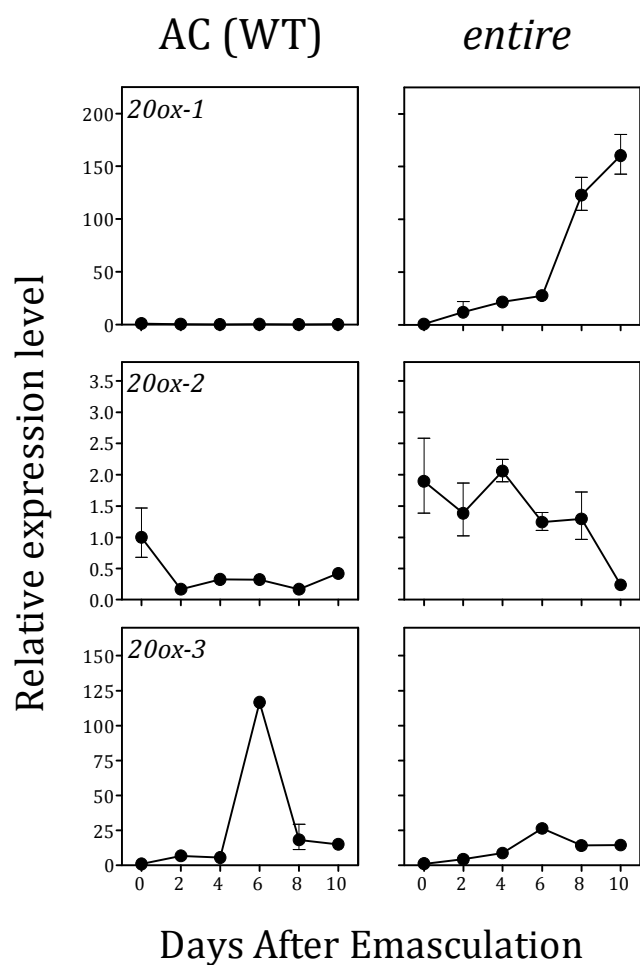


Figura 3-24 Livelli di espressione dei principali geni della biosintesi delle gibberelline appartenenti alla classe delle 20-ossidasi (*20ox-1*, *20ox-2*, *20ox-3*) in frutti non impollinati di AC ed *entire* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'emasculazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 di AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

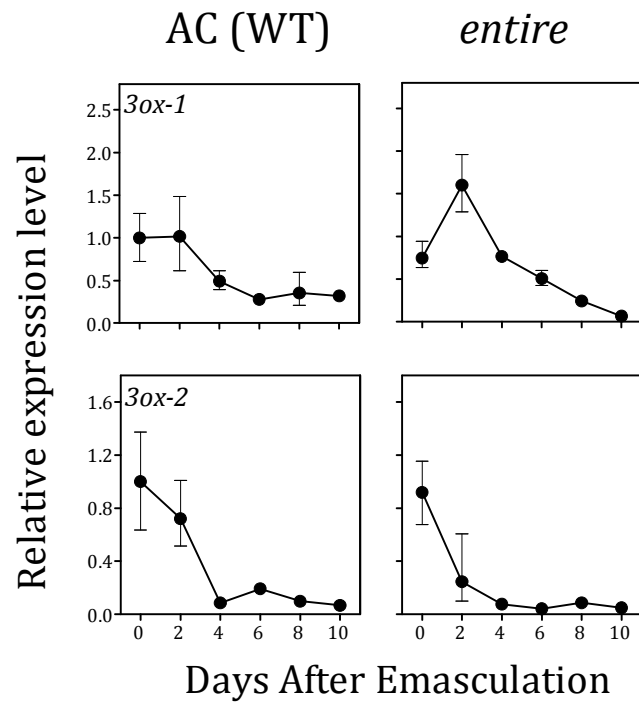


Figura 3-25 Livelli di espressione dei principali geni della biosintesi delle gibberelline appartenenti alla classe delle GA3 $\beta$ -ossidasi (*3ox-1* e *3ox-2*) in frutti non impollinati di AC ed *entire* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'emasculazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 di AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

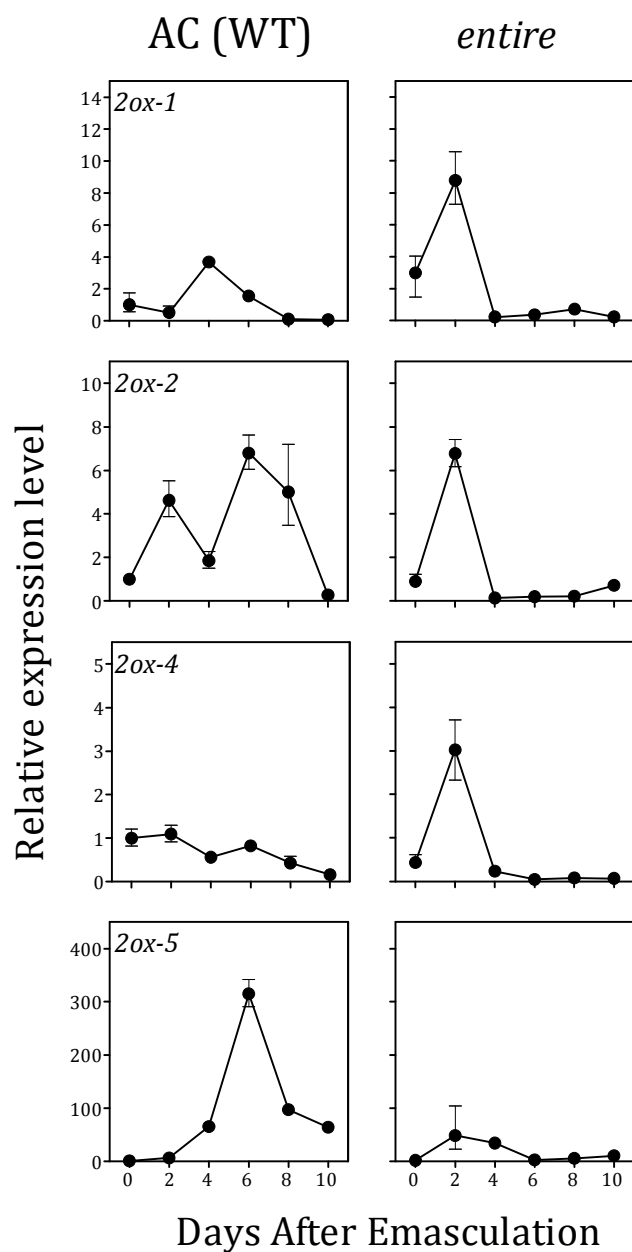


Figura 3-26 Livelli di espressione dei principali geni della biosintesi delle gibberelline appartenenti alla classe delle  $2\beta$ -ossidasi (*2ox-1*, *2ox-2*, *2ox-4* e *2ox-5*) in frutti non impollinati di AC ed *entire* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'emasculazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 di AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

### Regolazione dell'espressione del gene *ToFZY* durante lo sviluppo del frutto

In seguito alla scoperta del gene *ToFZY* (Rodriguez et al., 2007) codificante una flavina monoossigenasi coinvolta nel *pathway* di biosintesi dell'auxina, è stato possibile monitorare i livelli di trascrizione del gene nei frutti impollinati dei due mutanti e nei frutti partenocarpici di *entire*.

Sebbene con un livello di espressione maggiore in *dgt* rispetto ad AC, la regolazione del gene *ToFZY* nei frutti impollinati ha mostrato un andamento in cui il livello massimo di trascrizione ha coinciso con il quarto giorno dall'impollinazione (fig. 3-27). I frutti impollinati di *entire* invece mostravano dei bassi livelli di trascrizione da 0 a 6DAP ma con un aumento rapido a partire dall'ottavo giorno.

In assenza di impollinazione non si osserva alcuna espressione del gene in AC, mentre in *entire* è evidente un rapido aumento dell'espressione a 6 e 8 DAE (fig. 3-28).

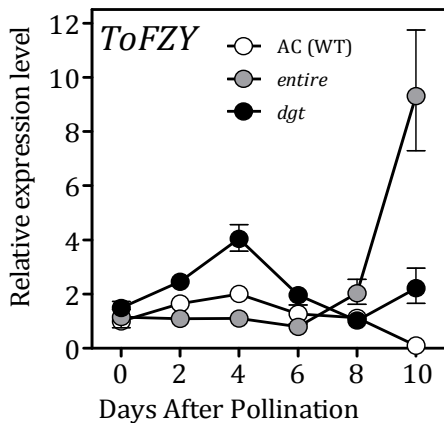


Figura 3-27 Livelli di espressione del gene *ToFZY* in frutti di AC, *entire* (*e*) e *diageotropica* (*dgt*) raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 di AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

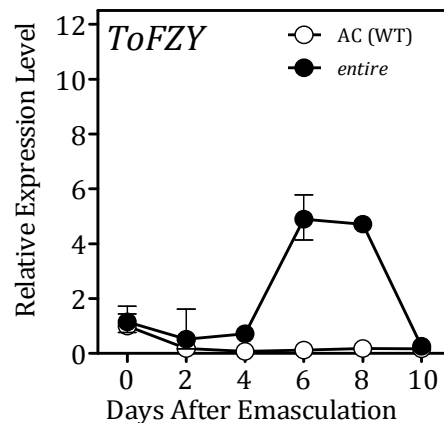


Figura 3-28 Livelli di espressione del gene *ToFZY* in frutti di AC ed *entire* raccolti a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni dall'emasculazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1 $\alpha$*  e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione al tempo 0 del AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

### *Effetto delle mutazioni sulla quantità di gibberelline endogene nei frutti*

Sono state quantificate le principali gibberelline appartenenti alla via di idrossilazione precoce sul carbonio 13 della GA<sub>12</sub> (*early 13-hydroxylation pathway*), considerata la via preferenziale durante lo sviluppo del frutto di pomodoro (Fos et al., 2000). In particolare nella tabella 3-5 sono riportati i livelli di GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>3</sub> e GA<sub>29</sub> in ovari impollinati e non dei tre genotipi. Le tabelle 3-5 e 3-6 elencano le concentrazioni di GAs trovate in frutti trattati con 4-CPA e 4-CPA più LAB 198999 in AC e in *entire*; in questi casi ai valori delle gibberelline precedentemente menzionate è stata aggiunto anche il dato relativo alla GA<sub>12</sub>.

Come atteso, l'impollinazione ha determinato in AC un aumento dei livelli di gibberelline rispetto ai frutti non impollinati. Nei frutti non impollinati di AC infatti GA<sub>19</sub>, GA<sub>1</sub> e GA<sub>29</sub> sono risultate al di sotto dei limiti di sensibilità dello strumento mentre i valori di GA<sub>20</sub> e GA<sub>8</sub> sono in quantità inferiori di oltre 2.5 e 3.5 volte rispetto ai frutti impollinati. Diverso è il caso della GA<sub>3</sub> in cui le concentrazioni nei frutti non impollinati sono simili a quelle riscontrate nei frutti impollinati (tabella 3-5).

A differenza dei frutti non impollinati di AC, per i frutti non impollinati del mutante *entire* è stato possibile rilevare quantità apprezzabili di tutte le gibberelline fatta eccezione per la GA<sub>5</sub>, la cui presenza nel frutto è stata quasi sempre al di sotto dei limiti strumentali. Tuttavia la concentrazione di GA<sub>8</sub> risultava inferiore rispetto ai frutti non impollinati di AC.

Sebbene, nei frutti partenocarpici del mutante, le concentrazioni ormonali erano significativamente inferiori rispetto a quelle misurate nei frutti impollinati, è interessante notare che la concentrazione di GA<sub>1</sub> nei frutti non impollinati di *entire* è apparsa 1,7 volte e oltre 3 volte superiore a quella dei frutti impollinati dello stesso mutante e di AC.

Nel caso dei frutti impollinati del mutante *dgt* le differenze maggiori rispetto ad AC si sono riscontrate a carico di GA<sub>19</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>3</sub> e GA<sub>29</sub>. Con la sola eccezione della GA<sub>29</sub> i cui livelli sono stati quasi doppi in *dgt* (16.3ng g<sup>-1</sup> p.f. contro gli 8.3ng g<sup>-1</sup> p.f. in AC), i livelli endogeni delle altre gibberelline sono apparse significativamente

inferiori e in modo particolare per la GA<sub>8</sub> i cui valori sono stati di 6 ng g<sup>-1</sup> p.f. nel mutante e di 20.1 ng g<sup>-1</sup> p.f. in AC (Tabella 3-5).

Tabella 3-5 Livelli endogeni di gibberelline (ng g<sup>-1</sup> p.f.) analizzati in frutti impollinati di AC, *entire* e *dgt* dopo 8 giorni dall'impollinazione. Evidenziati in grigio, i livelli endogeni in frutti non impollinati di AC ed *entire* dopo 8 giorni dall'emasculazione. I dati indicano la media ±SEM (n=3).

genotipo	GA <sub>19</sub>	GA <sub>20</sub>	GA <sub>1</sub>	GA <sub>8</sub>	GA <sub>5</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>29</sub>
AC (WT)	16.8 ±0.2	9.7 ±0.2	2.9 ±0.1	20.1 ±0.4	nd	4.2 ±0.5	8.3 ±0.2
<i>entire</i>	20.0 ±0.1	11.0 ±0.3	5.6 ±0.1	13.6 ±0.6	nd	4.9 ±0.2	10.3 ±0.2
<i>dgt</i>	13.5 ±0.1	9.8 ±0.2	2.1 ±0.1	6.0 ±0.3	nd	3.4 ±0.1	16.3 ±0.1
AC (WT) (non imp.)	nd	3.7 ±0.1	nd	5.6 ±0.4	nd	nd	nd
<i>entire</i> (non imp.)	8.4 ±0.2	3.7 ±0.2	9.5 ±0.2	4.1 ±0.2	nd	2.6 ±0.1	3.9 ±0.2

Il trattamento con 4-CPA (nella dose di 100ng ovario<sup>-1</sup>) sui frutti di AC, *entire* e *dgt* ha prodotto effetti diversi in termini di livelli di gibberelline nei frutti (Tabella 3-6).

In *entire*, il trattamento ha determinato un aumento di oltre 2.5 e quasi 2 volte la concentrazione nei frutti di GA<sub>19</sub> e GA<sub>1</sub> rispetto ad AC e un minor accumulo di GA<sub>8</sub> e GA<sub>3</sub>. Da notare inoltre il minor accumulo di GA<sub>12</sub> nel mutante, 45.3ng g<sup>-1</sup> p.f. contro i 130.8 ng g<sup>-1</sup> p.f. in AC (tabella 3-6).

Per quanto concerne il mutante *dgt* l'effetto del trattamento con auxina sintetica ha determinato effetti molto limitati sull'accumulo di gibberelline endogene nei frutti. In particolare la quantità di GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>3</sub> e GA<sub>29</sub> risultava 2, 2.5, 2.6, 2.2 e 1.7 volte inferiore rispetto a quanto analizzato in AC (tabella 3-6).

Tabella 3-6 Livelli endogeni di gibberelline (ng g<sup>-1</sup> p.f.) analizzati in frutti trattati con 4-CPA di AC, *entire* e *dgt* dopo 10 giorni dal trattamento. I dati indicano la media ±SEM (n=3).

genotipo	GA <sub>12</sub>	GA <sub>19</sub>	GA <sub>20</sub>	GA <sub>1</sub>	GA <sub>8</sub>	GA <sub>5</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>29</sub>
AC (WT)	130.8 ±8.1	12.2 ±0.2	7.8 ±0.3	1.9 ±0.4	11.1 ±0.1	0.6 ±0.1	9.9 ±0.6	4.5 ±0.7
<i>entire</i>	45.3 ±2.7	32.1 ±2.3	8.2 ±0.5	3.6 ±0.2	9.5 ±0.3	nd	7.9 ±0.1	4.7 ±0.1
<i>dgt</i>	-	6.4 ±0.1	2.7 ±0.1	1.1 ±0.1	4.3 ±0.1	nd	4.5 ±0.3	2.7 ±0.2

In seguito all'applicazione di 4-CPA (100ng ovario<sup>-1</sup>) e dell'inibitore della biosintesi delle gibberelline LAB 198999 (0.02µmol ovario<sup>-1</sup>), è stato possibile apprezzare in AC una diminuzione dei livelli endogeni di GA<sub>12</sub> (circa la metà), GA<sub>19</sub> (circa la metà), GA<sub>8</sub> (circa un terzo), GA<sub>3</sub> (circa la metà) e GA<sub>29</sub> (un terzo) rispetto al solo trattamento con l'auxina sintetica (tabella 3-6 e tabella 3-7). E' tuttavia da osservare che in *entire*, rispetto al trattamento con solo 4-CPA, l'inibizione da parte del LAB ha avuto effetti più evidenti solo sui livelli di GA<sub>19</sub> (circa ¾) GA<sub>8</sub> (circa la metà) e GA<sub>3</sub> (circa la metà) mentre GA<sub>20</sub> e GA<sub>29</sub> hanno subito un sensibile aumento. In generale, nel mutante l'aggiunta dell'inibitore al trattamento con auxina si è dimostrata molto meno efficace nel ridurre i livelli endogeni di gibberelline rispetto ad AC. Tuttavia, in AC si osserva, anche in questo caso, un maggior accumulo di GA<sub>12</sub> (tabella 3-7)

Tabella 3-7 Livelli endogeni di gibberelline (ng g<sup>-1</sup> p.f.) analizzati in frutti trattati con 4-CPA e LAB 198999 di AC, ed *entire* dopo 10 giorni dal trattamento. I dati indicano la media ±SEM (n=3).

genotipo	GA <sub>12</sub>	GA <sub>19</sub>	GA <sub>20</sub>	GA <sub>1</sub>	GA <sub>8</sub>	GA <sub>5</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>29</sub>
AC (WT)	79.0 ±1.3	6.7 ±0.9	6.6 ±0.2	3.5 ±0.1	3.4 ±0.1	nd	5.4 ±0.2	1.5 ±0.3
<i>entire</i>	41.3 ±2.6	22.4 ±0.6	9.1 ±0.1	3.3 ±0.2	5.8 ±0.6	nd	4.5 ±0.2	5.3 ±0.1

*Effetto dell'impollinazione e dei trattamenti ormonali sull'espressione nei frutti dei geni Aux/IAAs, LeSAUR e LeGH-3*

Sono stati analizzati i livelli di trascrizione di alcuni geni coinvolti nella percezione/trasduzione del segnale auxinico in risposta al trattamento con 4-CPA, GA<sub>3</sub> e dalla combinazione dei due ormoni. In particolare sono stati presi in considerazione i geni appartenenti alla famiglia AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) di pomodoro e in modo particolare *LeIAA1*, *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA9*, *LeIAA10*, *LeIAA11* e *LeIAA16* (Nebenführ et al., 2000; Balbi and Lomax, 2003; Wang et al., 2005; Serrani et al., 2008). Inoltre sono stati presi in considerazione due geni la cui espressione aumenta in risposta al trattamento con auxina esogena: *SAUR* e *GH-3* (Quint and Gray, 2006).

Gli istogrammi presentati in figura 3-29 riportano i livelli di espressione dei geni *Aux/IAA*, *LeSAUR* e *LeGH3* in frutti impollinati e raccolti dopo 10 giorni. Nel mutante auxino-ipersensibile *entire* per i geni *LeIAA8*, *LeIAA10*, *LeIAA11*, *LeSAUR* e *LeGH-3* non si notano differenze sostanziali rispetto ad AC in termini di espressione. Al contrario *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA16* risultano maggiormente indotti in modo significativo e per il solo gene *LeIAA9* si registra una *down-regulation*.

Nei frutti impollinati del mutante *dgt*, al contrario, si ha una forte riduzione dei trascritti di *LeIAA1*, *LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA10* e dei geni *LeSAUR* e *LeGH-3*. I geni *LeIAA2*, *LeIAA2*, *LeIAA9*, *LeIAA11*, *LeIAA16* non appaiono invece influenzati.

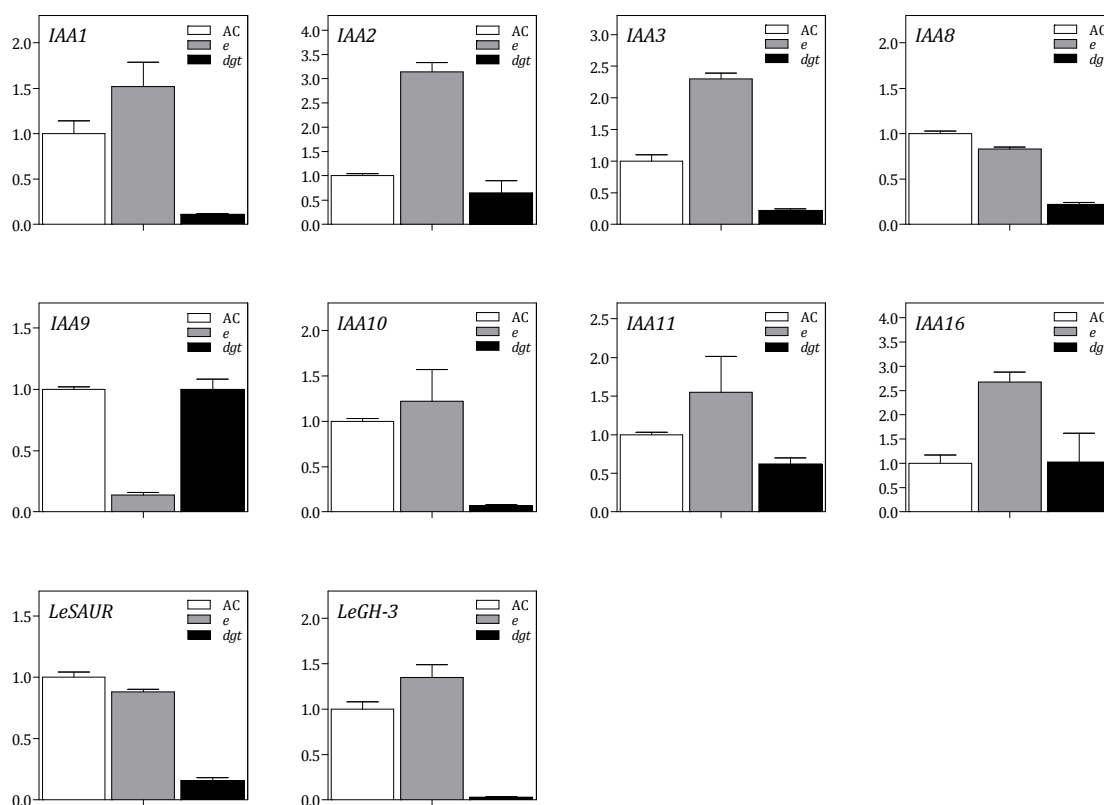


Figura 3-29 Livelli di espressione dei fattori di trascrizione *Aux/IAA*, *LeSAUR* e *LeGH-3*, in frutti di pomodoro di Ailsa Craig (AC), e dei mutanti *entire* (*e*) e *diageotropica* (*dgt*) dopo dieci giorni dall'impollinazione. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione in AC. I dati indicano la media  $\pm$ SD (n=3).

Come riportato in figura 3-30 la mancata applicazione di ormoni (mock) non ha determinato sostanziali variazioni nei livelli di espressione per la maggior parte dei geni in AC, *entire* e *dgt*. Tuttavia una maggior quantità di trascritto si osserva per i geni *LeIAA2*, *LeIAA11* e *LeIAA10* in *entire* e di *LeIAA10* e *LeIAA11* in *dgt* rispetto al loro background genetico AC. Meno espresso è risultato essere il gene *LeIAA9* in *entire*.

Come atteso, l'applicazione di 4-CPA ha determinato una notevole induzione di tutti i fattori di trascrizione *Aux/IAAs* in AC, con la sola eccezione per il gene *LeIAA16*. Anche in *entire* il trattamento con auxina ha determinato l'aumento dei livelli di trascrizione di quasi tutti i geni che, nel caso di *LeIAA10*, *LeIAA11*, *LeIAA16*

è stata superiore rispetto ad AC. Tuttavia, l'espressione del gene *LeIAA9* nel mutante non ha subito alcuna induzione in risposta all'auxina.

Per quanto riguarda il mutante *dgt*, è interessante osservare come il trattamento con 4-CPA non ha avuto alcun effetto di stimolo sull'espressione di tutti i geni presi in considerazione, addirittura nel caso di *LeIAA10*, e *LeIAA16* si assiste ad una sotto-regolazione.

In AC l'espressione dei geni *LeIAA1*, *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA10* e *LeIAA11* è apparsa indotta anche in risposta al trattamento con GA<sub>3</sub> sebbene in misura minore rispetto al trattamento con 4-CPA. Per i geni *LeIAA9* e *LeIAA16* al contrario non ci sono differenze rispetto al mock.

Nel mutante *entire* il trattamento con GA<sub>3</sub> ha regolato positivamente l'espressione solamente del gene *LeIAA1* e anche in questo caso in misura minore rispetto al trattamento con auxina. Nel mutante la gibberellina ha avuto invece un effetto inibitorio sull'espressione dei geni *LeIAA9* e *LeIAA10*.

E' interessante osservare che lo stimolo indotto dalla GA<sub>3</sub> in *entire* è risultato per alcuni geni inferiore rispetto ad AC (*LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA11*, *LeIAA9*).

In *dgt*, rispetto sia al mock che al trattamento con 4-CPA, lo stimolo derivante dalla GA<sub>3</sub> ha avuto un effetto induttivo nei confronti di alcuni geni *Aux/IAA*, soprattutto per *LeIAA1* e *LeIAA2*. Nel caso di *LeIAA8*, *LeIAA9*, *LeIAA11* invece non è stato registrato alcun cambiamento nell'espressione mentre *LeIAA10* è risultato addirittura represso.

In seguito all'applicazione combinata di 4-CPA e GA<sub>3</sub>, appare evidente in AC una notevole riduzione dell'espressione di *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA9*, *LeIAA1* rispetto al solo trattamento con auxina. Lo stesso comportamento si osserva anche per *entire* solo che oltre ai geni sopramenzionati anche *LeIAA10* e *LeIAA16* sono risultati sotto-regolati nel mutante in presenza dei due ormoni rispetto alla sola auxina.

Con la sola eccezione di *LeIAA10* che appare fortemente represso, in *dgt* i livelli di trascrizione di tutti gli altri fattori di trascrizione *Aux/IAA* sono risultati molto simili rispetto a quanto misurato in AC, successivamente all'applicazione di 4-CPA e GA<sub>3</sub>. Per quanto riguarda l'espressione dei geni *LeSAUR*, il trattamento con 4-CPA non ha avuto effetto in AC né in *dgt*. Al contrario in *entire* lo stesso trattamento

determina un'induzione del gene quasi 10 volte superiore rispetto al non trattato (fig. 3-29). Sebbene l'applicazione di sola GA<sub>3</sub> non provochi alcuno stimolo del gene *LeSAUR* nei tre genotipi, la combinazione con 4-CPA ne induce l'espressione in *entire* e in *dgt*. Nel caso del gene *LeGH-3*, il trattamento con auxina ne ha stimolato l'espressione in *AC* ed *entire* ma non in *dgt*. Analogamente a quanto visto per il gene *LeSAUR*, anche il gene *LeGH-3* non è stimolato dopo il trattamento con gibberellina. Tuttavia la quantità di trascritto del gene aumenta in presenza di GA<sub>3</sub> e 4-CPA in tutti i genotipi.

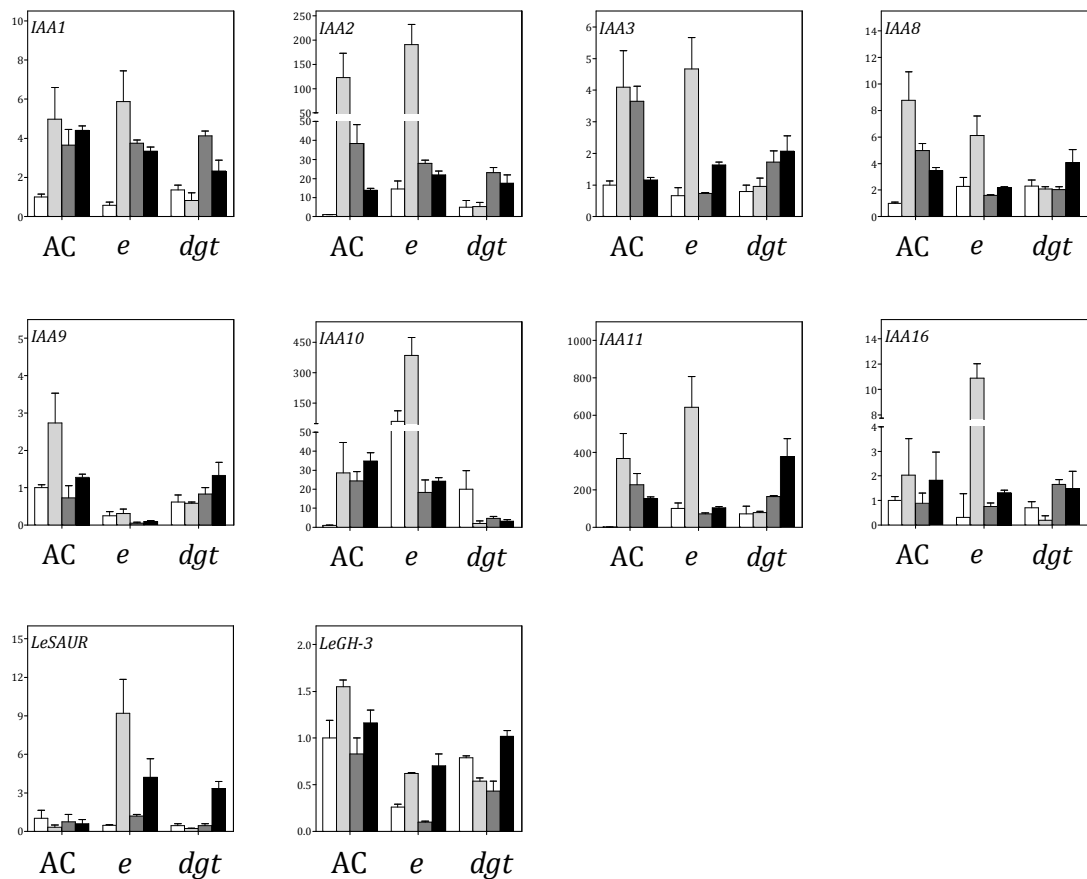


Figura 3-30 Livelli di espressione dei fattori di trascrizione *Aux/IAA*, *LeSAUR* e *LeGH-3* in frutti di pomodoro di Ailsa Craig (AC), e dei mutanti *entire* (*e*) e *diageotropica* (*dgt*) in risposta ai trattamenti con mock (□), 4-CPA (■), GA<sub>3</sub> (■) e 4-CPA+GA<sub>3</sub>(■). I frutti sono stati raccolti dopo 10 giorni dal trattamento. Per mock si intende il trattamento con una soluzione di etanolo all'1% + Tween 20® allo 0,1%. I livelli di trascrizione sono stati tutti normalizzati con l'espressione del gene housekeeping *LeEF1α* e attribuendo come valore unitario per ciascun gene all'espressione del mock di AC. I dati indicano la media ±SD (n=3).

**Cap. 4**

# **Discussione**

Il normale processo di sviluppo di un frutto è strettamente controllato da un insieme coordinato di segnali in grado di determinare con successo l'allegagione dei fiori (Gillaspy et al., 1993). E' noto che diverse classi ormonali intervengono nella regolazione di questo processo secondo una precisa rete di reciproca interazione (Gillaspy et al., 1993; Ozga and Reinecke, 2003; Srivastava and Handa, 2005). Tra questi, l'auxina è considerata una delle principali molecole ormonali coinvolte nelle fasi iniziali dello sviluppo del frutto e il cui aumento, in risposta alla fecondazione, è causa di una successione di eventi che porta alla crescita del frutto (Vivian-Smith et al., 2001; Pandolfini et al., 2007; Dorsey et al., 2009). L'indagine svolta in questo lavoro di tesi ha condotto alla caratterizzazione del mutante auxino-insensibile, *diageotropica* (*dgt*) (Kelly and Bradford, 1986), e del mutante *entire*, la cui mutazione interessa il gene *LeIAA9*, uno dei fattori di trascrizione coinvolti nella repressione del segnale auxinico (Zhang et al. 2007; Wang et al., 2005). Questo tipo di approccio ha fornito evidenze interessanti che l'alterazione del segnale auxinico (ridotta sensibilità o attivazione costitutiva della risposta all'auxina) influenza alcuni aspetti significativi della crescita e sviluppo del frutto. Similmente a quanto riportato da Balbi and Lomax (2003) le dimensioni del frutto di *dgt* sono risultate significativamente ridotte rispetto ad AC (fig. 3-1). Le dimensioni di un frutto di pomodoro sono dovute al contributo congiunto della divisione e dell'espansione delle cellule (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Bohner and Bangerth, 1988). A seguito di osservazione di tipo istologico è possibile ipotizzare che le ridotte dimensioni del frutto di *dgt*, osservate già in fase molto precoce dello sviluppo, siano almeno in parte dovute ad una minore crescita del pericarpo determinata da una riduzione delle dimensioni delle cellule (fig. 3-2c,c1; tab. 3-1). La minore espansione delle cellule osservata in *dgt* troverebbe conferma nella minore espressione del gene che codifica per una espansina, *LeEXP2*, coinvolta nel processo di distensione delle cellule (fig. 3-3). E' stato infatti riportato che il gene risulta preferenzialmente espresso durante le fasi iniziali dello sviluppo del frutto di pomodoro ed è stata dimostrata la sua induzione da parte dell'auxina stessa (Catalá et al., 2000). E' quindi possibile che tra le risposte mediate dal segnale auxinico ci sia anche l'espansione delle cellule del pericarpo dei frutti di pomodoro.

Tuttavia nelle linee di piante transgeniche in cui è stato silenziato, mediante tecnologia antisense, il gene repressore *LeIAA9*, si è registrata l'attivazione precoce nell'ovario di alcuni geni connessi al ciclo di divisione cellulare (Wang et al., 2009). Altri autori sostengono che l'effetto dell'auxina sull'espansione delle cellule del pericarpo dei frutti sia un effetto indiretto. Infatti, affermano che una parte del segnale auxinico, attraverso il fattore di trascrizione SLARF7, determini l'attivazione del segnale gibberellinico, a cui sia da attribuire, tra le altre cose, l'aumento del volume cellulare (de Jong et al., 2010).

I dati sulla morfologia dei frutti impollinati del mutante *entire* non indicano differenze sostanziali né in termini di numero delle cellule né di espansione cellulare, lasciando pensare che nell'ovario impollinato l'effetto della mutazione sul controllo dell'espansione e/o divisione cellulare sia ridotto o nullo.

Come è noto, la crescita partenocarpica del frutto di pomodoro può essere indotta a seguito dell'applicazione di auxina esogena (Büngher-Kibler and Bangerth, 1988; Koshioka et al., 1994). La risposta degli ovari all'ormone è proporzionale alla dose applicata fino al raggiungimento di una soglia oltre la quale la crescita del frutto si arresta o addirittura diminuisce (Serrani et al., 2007a). Dai nostri dati appare evidente che la stessa concentrazione di 4-CPA applicata su ovari di *entire* causa una crescita ponderale di quasi due volte maggiore rispetto ad AC e di oltre dieci rispetto a *dgt* (fig. 3-10a). Sebbene la ridotta crescita del mutante *dgt* non sorprenda in modo particolare, visto che è considerato un mutante resistente all'auxina, in *entire* la mutazione sul gene *LeIAA9* sembra predisporre il frutto a una maggiore sensibilità all'ormone. A supporto di questa osservazione su *entire*, sono riportati alcuni dati ottenuti su piante silenziate per il gene *LeIAA9*. Infatti, Wang et al. (2005) hanno osservato che in queste piante l'effetto dell'applicazione di auxina esogena su ipocotili, determinava un allungamento maggiore rispetto al *wild-type* e una proliferazione di radici avventizie anche a dosi molto basse di NAA in espianti coltivati *in vitro*.

Uno degli effetti del trattamento auxinico è lo stimolo delle divisioni cellulari nel frutto e nei tessuti vegetativi come possibile conseguenza dell'induzione di alcuni geni legati al ciclo cellulare (Serrani et al., 2007a; Fu et al., 2010; Guo et al., 2010).

La maggiore risposta al trattamento con 4-CPA in *entire* infatti si manifesta con un sostanziale aumento dello spessore del pericarpo come conseguenza di una maggiore proliferazione del numero di cellule (fig. 3-11b; tab. 3-3).

L'importanza di un equilibrio fra i due ormoni nella regolazione dello sviluppo del frutto si rende evidente dal fatto che dalla combinazione di 4-CPA e GA<sub>3</sub>, rispetto al solo trattamento con auxina, si ottiene una riduzione del numero di cellule del pericarpo in *entire* (fig. 3-11h; tab. 3-3) e un aumento in *dgt* (fig. 3-11i; tab. 3-3) fino a raggiungere valori simili ai frutti impollinati. È interessante notare che in *dgt* il tessuto locale si forma solo in presenza della miscela auxina-gibberellina ma non in presenza di sola auxina o GA<sub>3</sub>.

Anche l'applicazione di sole gibberelline è in grado di stimolare la crescita del frutto in pomodoro (fig. 3-10b), in accordo con quanto riportato in letteratura (Wittwer et al., 1957). Tuttavia gli effetti da un punto di vista anatomico e cellulare sono diversi da quelli osservati con 4-CPA. I risultati ottenuti in questo studio confermano, come riportato in precedenti lavori (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Serrani et al., 2007a), che l'applicazione di GA<sub>3</sub> agli ovai di AC esercita un effetto di stimolo prevalentemente sull'espansione delle cellule del mesocarpo interno riducendo il numero di strati cellulari (fig. 3-11d; tab. 3-3). L'aumento delle dimensioni cellulari nel pericarpo e la corrispondente inibizione delle divisioni sembra infatti essere controllato dal segnale gibberellinico mediato dalla proteina SIDEELLA (Martí et al., 2007).

In *entire*, il trattamento con GA<sub>3</sub>, sebbene determini una crescita maggiore del frutto rispetto ad AC (fig. 3-10b), non porta ad un incremento né dello spessore del pericarpo né una maggiore espansione delle cellule. Al contrario le cellule risultano più piccole e più numerose, come indica il numero più alto di strati cellulari (fig. 3-11e; tab. 3-3). Oltre a questo, risulta evidente che nei frutti di *entire* trattati con gibberellina si ha la formazione di un tessuto locale completamente sviluppato a differenza di AC e *dgt* (fig. 3-12). Quest'ultimo fatto permette alcune interessanti considerazioni in merito al ruolo sinergico e sull'intima connessione fra auxina e gibberelline nella regolazione dello sviluppo completo di un frutto. Come riportato da alcuni autori (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Serrani et al., 2007a), l'applicazione di GA<sub>3</sub> porterebbe a uno sbilancio ormonale tra gibberelline e auxine

con effetti negativi sulle divisioni cellulari e sulla formazione del tessuto locale. In *entire*, tuttavia, la mancata repressione imposta dalla proteina IAA9, potrebbe attivare almeno parzialmente il *signalling* auxinico attenuando così gli effetti di uno squilibrio ormonale a seguito del trattamento con GA<sub>3</sub>.

Il mutante *procera* (*pro*) è interessato da una mutazione a carico del gene *LeGAI* che codifica per una proteina DELLA (Jasinski et al., 2008). A differenza di *Arabidopsis* per la quale sono state identificate almeno cinque diverse proteine (Swain and Singh, 2005), *LeGAI* è la sola proteina DELLA identificata in pomodoro (Bassel et al., 2004). In virtù della mancata repressione sul segnale delle gibberelline, nel mutante *pro*, si ha la formazione di frutti partenocarpici in modo del tutto analogo a quanto avviene per effetto del trattamento con GA<sub>3</sub>, vale a dire: frutti di piccole dimensioni, notevole spessore del pericarpo, e ridotto tessuto locale (fig. 3-19). In seguito all'introduzione della mutazione *entire* nel background genetico di *pro*, è stato possibile ottenere piante che producevano spontaneamente frutti partenocarpici di dimensioni significativamente maggiori e in cui era evidente lo sviluppo di un tessuto locale pienamente sviluppato (fig. 3-19). Coerentemente con quanto sostenuto, queste osservazioni lasciano pensare che il gene *LeIAA9* possa agire come repressore della formazione del tessuto locale nel frutto di pomodoro in modo indipendente dal segnale gibberellinico.

Sebbene ancora non siano del tutto chiare le ragioni, la mutazione *pro*, pur interessando l'unica proteina DELLA di pomodoro, non determina la totale saturazione della risposta alle GAs (Van Tuinen et al., 1999). Pertanto è ancora possibile che l'attivazione del segnale auxinico come conseguenza della mutazione *entire* nel doppio mutante, possa esercitare ancora un'azione mediata dalle GAs esaltandone il segnale.

In ogni caso, quest'ultima osservazione insieme alle altre descritte finora, costituisce una evidenza significativa a sostegno dell'ipotesi che il normale sviluppo del frutto di pomodoro sia controllato strettamente dalla cooperazione tra auxine e gibberelline (Bünger-Kibler and Bangerth, 1982; Lemaire-Chamley et al., 2005; Serrani et al., 2007a; Vriezen et al., 2008).

Il frutto di pomodoro può essere considerato un modello di studio per quanto riguarda l'endoreduplicazione, non solo per i livelli spettacolari di endopoliploidia

raggiunti, ma anche perché questo fenomeno sembra coinvolto nel processo di crescita del frutto (Chevalier et al., 2011). In pomodoro, infatti, il grado di ploidia delle cellule è strettamente correlato con le dimensioni delle cellule e con le dimensioni finali raggiunte dal frutto, lasciando supporre che l'endopoliploidia possa essere uno dei fattori che determinano l'espansione delle cellule nei tessuti del frutto (Cheniclet et al., 2005). Durante la fase di espansione cellulare, nel pericarpo e nel tessuto locale si registra infatti un arresto delle attività mitotiche per effetto dell'inibizione delle CDK e a cui fanno seguito diversi cicli di endoploidizzazione (Joubès et al., 1999; 2000; Bisbis et al., 2006). Nei frutti impollinati di AC già dopo 10 giorni è possibile osservare un certo grado di ploidizzazione delle cellule nel pericarpo e nel tessuto locale (fig. 3-5a,a<sub>1</sub>). Nel pericarpo ad esempio, l'inizio dei cicli di endoreduplicazione e la comparsa dei nuclei 8C ha inizio già a partire dal terzo giorno dall'antesi (Cheniclet et al., 2005). Come indicato dagli stessi autori, il pericarpo presenta solitamente una più ampia distribuzione di valore C rispetto al tessuto locale a causa di una maggiore eterogeneità nelle tipologie di cellule che lo compongono.

Sul ruolo degli ormoni nel controllo della transizione da divisione cellulare a endoreduplicazione sappiamo che uno degli effetti dell'auxina in *Arabidopsis*, è quello di agire come repressore, in quanto il blocco della percezione dell'ormone produce un aumento dei livelli di ploidia (Ishida et al., 2010). Inoltre, sono state identificate regioni AuxRE (*Auxin Responsive Elements*) all'interno di sequenze promotrici di geni per alcune cicline, suggerendo che questi geni siano veri e propri *target* primari dell'auxina (Perrot-Rechenmann, 2010). Nel mutante *dgt*, tuttavia, l'effetto di una ridotta sensibilità all'ormone non determina né una riduzione del numero di cellule né un aumento dei livelli di ploidia nei tessuti del frutto impollinato (fig. 3-5c,c<sub>1</sub>; fig. 3-6). I minori livelli di ploidia nel pericarpo dei frutti di *dgt* è coerente col dato relativo alle minori dimensioni delle cellule in virtù della correlazione lineare fra il numero di endocicli, la crescita delle cellule e le dimensioni del frutto (Nafati et al., 2011). E' noto infatti che non tutto il segnale auxinico risulta bloccato in *dgt* (Nebenführ et al., 2000). Per alcune risposte mediate dall'auxina sembra che esistano vie DGT-dipendenti e vie DGT-indipendenti (Coenen et al., 2002). Si potrebbe pertanto ipotizzare il

coinvolgimento nel frutto del gene *DGT* sull'espansione delle cellule piuttosto che nella regolazione del loro ciclo mitotico. E' infatti noto che la mutazione *dgt* influenza negativamente l'estrusione di protoni associata all'allungamento di ipocotili, nonché impedisce l'espansione di protoplasti in risposta all'IAA (Coenen et al., 2002; May et al., 2003). E' stato inoltre riportato che la mutazione *dgt* regola l'espressione di alcuni geni coinvolti nell'espansione delle cellule favorendo l'estensibilità delle pareti cellulari (Catalá et al., 1997; 2001). Oltre a ipotizzare un effetto diretto della ridotta sensibilità all'auxina in *dgt* sull'espansione cellulare non è possibile escludere un effetto indiretto, legato ad esempio all'interazione con altri ormoni coinvolti nello stimolo dell'espansione delle cellule.

La maggiore risposta al trattamento con 4-CPA esibita dal mutante *entire*, se da una parte ha prodotto un aumento del numero di cellule del pericarpo, dall'altra non ha influenzato in modo sostanziale il profilo di ploidia e di MCV rispetto ad AC (fig. 3-13b; tab. 3-4). Sebbene Serrani et al. (2007a) riportino che i frutti partenocarpici ottenuti con 2,4-D hanno valori di MCV minori rispetto ai frutti impollinati, queste differenze si rendono apprezzabili solo in tempi successivi al decimo giorno e non interessano tutti i tessuti del frutto. A differenza del pericarpo, è interessante osservare che in risposta al trattamento con 4-CPA, in *entire* il tessuto locale raggiunge valori medi di ploidia superiori al frutto impollinato (fig. 3-13b<sub>1</sub>; tab. 3-4). Apparentemente, la mutazione sul gene *IAA9*, predispone il tessuto locale a una maggiore risposta al trattamento a conferma ancora una volta del ruolo cruciale dell'auxina nel differenziamento e sviluppo di questo tessuto (Lemaire-Chamley et al., 2005).

Uno fra gli effetti delle gibberelline a livello cellulare, riguarda lo stimolo delle endoreduplicazioni dei nuclei osservato in ipocotili di *Arabidopsis*, in cellule di epidermide fogliare di frumento e più recentemente in tessuti del frutto di pomodoro (Gendrau et al., 1999; Cavallini et al., 1995; Serrani et al., 2007a). In accordo con quanto riportato, nel pericarpo di AC trattati con una dose ottimale di GA<sub>3</sub> (2µg/ovario) si osserva un pattern più eterogeneo di ploidia in confronto ai frutti impollinati, con nuclei fino a 32C (fig. 3-14a). Effetti minori si osservano nel tessuto locale (fig. 3-14a<sub>1</sub>). Tuttavia, la combinazione di 4-CPA e GA<sub>3</sub>, attenua il grado di ploidia delle cellule del pericarpo riportandola su livelli analoghi alla

condizione di frutto impollinato (fig. 3-15a). Infatti, oltre ad avere effetti additivi sulla crescita degli ovari trattati con gibberelline, la presenza simultanea delle auxine riproduce effetti riconducibili alla situazione osservata nel frutto impollinato (Serrani et al., 2007a; Büniger-Kibler and Bangerth, 1982). In virtù di quanto detto finora, non sorprende pertanto che il trattamento con GA<sub>3</sub> induca in *entire* livelli di ploidia nel pericarpo e nel tessuto loculare molto simili a quelli misurati nei frutti impollinati (fig. 3-14b,b<sub>1</sub>). Anche in questo caso si può probabilmente ipotizzare che la parziale attivazione della via di trasduzione del segnale auxinico in *entire* sia sufficiente a limitare gli effetti di uno squilibrio di gibberellina nel frutto.

In pomodoro, l'impollinazione e la fecondazione portano ad un aumento dei livelli di auxina e gibberelline all'interno dell'ovario (Bohner and Bangerth, 1988; Koshioka et al., 1994; Serrani et al., 2007b; Serrani et al., 2008; Mariotti et al., 2011). Come atteso, il trattamento con LAB198999, un inibitore del metabolismo delle gibberelline specifico per le diossigenasi ossoglutarato dipendenti Rademacher (2000), provoca una netta diminuzione della crescita dei frutti di AC (tab. 3-2). A questo si aggiunge che, rispetto ai frutti non impollinati, l'impollinazione porta ad un maggior accumulo di gibberelline in AC (tab. 3-5). Questi dati confermano che lo sviluppo del frutto a seguito dell'impollinazione è mediato in parte dalle gibberelline.

L'ossidazione del C20 delle gibberelline è considerato un passaggio chiave nella regolazione dei livelli delle GAs attive e quindi nel controllo dello sviluppo (Rebers et al., 1999; Desgagné-Penix and Sponsel, 2008). La regolazione positiva dei geni delle GA20 ossidasi nei frutti impollinati è chiaramente dimostrata dal fatto che nei frutti impollinati di AC l'espressione del gene *GA20ox-1* aumenta progressivamente fino a 8 giorni mentre in quelli non impollinati risulta assente (fig. 3-20; fig. 3-24). Diverso è il caso del mutante *entire*, poiché anche in assenza dello stimolo derivante dall'impollinazione si rileva una certa induzione dell'espressione della *GA20ox-1* nei frutti (fig. 3-24). Tuttavia bisogna far notare che nei frutti impollinati di *entire* l'induzione della *GA20ox-1* appare notevolmente maggiore rispetto ai frutti non impollinati. Per quanto riguarda il mutante auxino-insensibile *dgt*, è

significativo il fatto per cui a seguito dell'impollinazione, i geni della *GA20ox-1* e *-2* subiscono soltanto una modesta induzione (fig. 3-20). Le variazioni nell'espressione dei geni delle GA20 ossidasi osservate in *entire* e in *dgt*, suggeriscono che un'alterazione nel sistema di *signalling* dell'auxina è in grado di influenzare nel frutto la regolazione dell'espressione di questa famiglia multigenica e in modo particolare della *GA20ox-1*. In *Arabidopsis*, l'induzione dei geni del metabolismo delle GAs, avviene rapidamente dopo il trattamento con auxina ed è mediata dal proteasoma 26S (responsabile della degradazione e del *turnover* delle proteine Aux/IAA), e risulta alterata da mutazioni nel sistema di trasduzione del segnale auxinico (Frigerio et al., 2006). Sebbene ancora manchino prove certe, è plausibile pensare che i geni del metabolismo delle GAs siano tra i bersagli primari del *signalling* dell'auxina e che la loro regolazione sia affidata all'interazione tra i fattori di trascrizione Aux/IAAs e le proteine ARF.

Diversamente dai geni della famiglia delle GA20 ossidasi, l'espressione dei geni della famiglia delle GA3 $\beta$ -ossidasi non aumenta in seguito all'impollinazione ma al contrario diminuisce progressivamente dopo la fecondazione (fig. 3-21). Questi dati, confermano pienamente quanto osservato in pomodoro da Serrani et al. (2007b) sul mutante Micro-Tom, da Rebers et al. (1999) e da Olimpieri et al. (2007). Sono invece in contrasto con quanto riportato in pisello in cui l'espressione dei geni delle GA3 $\beta$ -ossidasi aumenta dopo l'impollinazione (Ozga et al., 2009) lasciando pensare che la regolazione del metabolismo delle GAs vari da specie a specie. Olimpieri et al. (2007) e Serrani et al. (2007b) sono concordi nel sostenere che in pomodoro l'attività delle 3 $\beta$ -ossidasi non costituisca un punto di regolazione del flusso delle gibberelline in quanto, a differenza delle GA20 ossidasi, l'induzione di questi geni nell'ovario appare costantemente bassa e non influenzata dall'impollinazione.

Tuttavia, nei frutti partenocarpici del mutante *entire* i livelli di trascrizione del gene *GA3ox-1* si mantengono più elevati rispetto al frutto impollinato durante tutto il periodo compreso fra 0 e 10 giorni dall'emasculazione (fig. 3-25). Ciò che si osserva in questi frutti potrebbe essere dovuto a un effetto diretto, legato alla parziale attivazione di un segnale auxinico. È stato infatti riportato che nel frutto di pomodoro e in pisello l'auxina svolge un effetto di stimolo sulla trascrizione del

gene *GA3ox-1* (Serrani et al., 2008; Ozga et al., 2003). In alternativa, è possibile che la maggiore espressione del gene della *GA3ox-1* nei frutti partenocarpici di *entire* rispetto a quelli impollinati, sia legata a un meccanismo di regolazione omeostatica dei livelli endogeni di GAs. Il minor flusso di gibberelline, causato probabilmente da una minore attivazione dei geni delle GA20 ossidasi rispetto ai frutti impollinati, potrebbe stimolare i geni delle GA3 $\beta$ -ossidasi nei frutti partenocarpici. E' infatti ampiamente documentato che il mantenimento dei livelli adeguati di gibberelline attive in *Arabidopsis* si avvale di un sistema a *feedback* sui geni delle 3 $\beta$ -ossidasi poiché risultano indotti in mutanti *GA-deficient* ma repressi a seguito di applicazioni di gibberelline esogene (riportato da Yamaguchi 2008). Questo tipo di regolazione è presente anche in pomodoro poiché è stato osservato che il mutante gibberellino-deficiente, *gib-1*, accumula quantità considerevolmente maggiori rispetto al proprio *wild-type* di trascritti per i geni della *GA3ox-1* e -2 (Rebers et al., 1999).

I dati finora riportati indicano che a differenza degli ovari di AC, anche in assenza del segnale generato dall'impollinazione, negli ovari del mutante *entire* si attiva un certo metabolismo gibberellinico confermato dalla presenza di gibberelline e in modo particolare di GA<sub>1</sub> (tab. 3-5). Questo fatto potrebbe essere in parte correlato con lo sviluppo partenocarpico del frutto come è stato proposto per il mutante partenocarpico *pat* (Olimpieri et al., 2007). Tuttavia a differenza di *pat* l'attivazione del metabolismo ormonale in *entire* appare molto più tardiva. D'altra parte però se il metabolismo gibberellinico è annullato completamente in *entire*, come si verifica nel doppio mutante *e/gib-1*, lo sviluppo spontaneo del frutto non avviene. Lo sviluppo partenocarpico del frutto di *entire* sembra essere pertanto legato almeno in parte ad uno stimolo del metabolismo gibberellinico.

I livelli endogeni di gibberelline non sono solo il risultato di un processo di biosintesi ma anche di catabolismo e inattivazione (Hedden and Phillips, 2000). La 2 $\beta$ -ossidazione è ritenuta il principale meccanismo di inattivazione delle gibberelline (riportato in Yamaguchi 2008). Analogamente a quanto riportato da Serrani et al. (2007b), i dati relativi agli ovari AC ed *entire* (fig. 3-22) suggeriscono che l'aumento dei livelli endogeni di gibberelline per effetto dell'impollinazione

non sia legato ad una minore attività delle 2 $\beta$ -ossidasi, in quanto si ha una forte induzione soprattutto della *GA2ox-5* in corrispondenza della fase di massimo accrescimento dei frutti e di massima espressione del gene *GA2ox-1*.

E' interessante osservare che nei frutti del mutante *dgt* a un minor stimolo delle 2 $\beta$ -ossidasi corrisponda una ridotta espressione del gene della *GA2ox-5*. Una minore attività delle 2 $\beta$ -ossidasi trova conferma dal confronto dei livelli di GA<sub>8</sub> che in *dgt* risultano molto più bassi rispetto ad AC (tab. 3-5). Poiché la GA<sub>8</sub> è l'immediato prodotto biologicamente inattivo della GA<sub>1</sub>, è plausibile ritenere che in *dgt* la sintesi di GA<sub>1</sub> sia ridotta, in accordo con quanto proposto in pisello da Ozga et al. (2009). Questi dati possono suggerire che nel frutto di pomodoro il controllo del catabolismo delle gibberelline segua un meccanismo di *feed-forward* in cui minori livelli di gibberelline attive determinano una riduzione del catabolismo attraverso una *down-regulation* dei geni delle 2 $\beta$ -ossidasi (Thomas et al., 1999; Elliott et al., 2001).

Se questo è vero, non è chiaro il significato biologico degli alti livelli di GA<sub>29</sub> (catabolita della GA<sub>20</sub>) misurati nel mutante *dgt* in corrispondenza dell'ottavo giorno dall'impollinazione (tab. 3-5). La GA<sub>20</sub> può infatti essere resa attiva mediante la conversione a GA<sub>1</sub> o inattivata tramite conversione in GA<sub>29</sub> (Yamaguchi, 2008). Alcuni lavori in pisello e in *Arabidopsis* riportano che la conversione della GA<sub>20</sub> a GA<sub>29</sub> in segmenti di fusto avviene preferenzialmente in assenza di IAA nel mezzo di incubazione (O'Neill and Ross, 2002; O'Neill et al., 2010). A tale proposito, O'Neill et al. (2010) sostengono che l'IAA, oltre a promuovere la 3 $\beta$ -ossidazione della GA<sub>20</sub> a GA<sub>1</sub>, andrebbe ad inibire la 2 $\beta$ -ossidazione della GA<sub>20</sub> a GA<sub>29</sub>. Sulla base di queste informazioni, si può ipotizzare che in *dgt* la ridotta percezione del segnale auxinico dovuto all'impollinazione favorisca questo *shift* del metabolismo verso la GA<sub>29</sub>. Complessivamente la minore attivazione dei geni delle 20 ossidasi e la più elevata conversione della GA<sub>20</sub> in GA<sub>29</sub> concorrerebbe a diminuire il flusso ormonale verso le gibberelline attive (GA<sub>1</sub>). L'ipotesi che nei frutti di *dgt* il flusso di gibberelline attive risulti di ridotto, è stata verificata studiando il profilo di espressione del gene *GAST1*. Poiché la trascrizione di questo gene è stimolata in modo specifico dalle gibberelline (Shi et al., 1992), la

minore induzione del gene in *dgt* rispetto ad AC (fig. 3-23) da credito a quanto sostenuto.

Al contrario di quanto si osserva nei frutti impollinati di *entire*, nei frutti partenocarpici, non si ha alcuna induzione dei geni delle 2 $\beta$ -ossidasi dal quarto giorno in poi (fig. 3-26). La *down-regulation* delle 2 $\beta$ -ossidasi a cui si assiste nei frutti partenocarpici, è coerente con l'induzione delle 3 $\beta$ -ossidasi e delle GA20-ossidasi anche se restano valide anche in questo caso due interpretazioni. La prima come effetto diretto di un segnale auxinico, come riportato da Serrani et al. (2008) in pomodoro e da Ozga et al. (2009) in pisello e la seconda legata a un minor flusso di GAs nei frutti partenocarpici rispetto agli impollinati che innescherebbe un tipo di regolazione a *feed-forward* (Thomas et al., 1999).

Secondo il modello attualmente accettato, in seguito all'impollinazione e alla fecondazione si verifica un aumento dei livelli endogeni di auxina tale da permettere la de-repressione degli *auxin-response genes* e stimolare l'allegagione (Pandolfini et al., 2007; Goetz et al., 2007; Ren et al., 2011). E' possibile che alla base di questo *burst* di auxina ci sia l'attivazione della biosintesi di auxina nei tessuti dell'ovario (Dorcey et al., 2009). Secondo alcuni autori ogni volta che è necessaria la biosintesi di alti livelli di acido indolacetico nella pianta verrebbe attivata la via di biosintesi dell'IAA attraverso il triptofano (Zazimalova and Napier, 2003). Il gene *ToFZY* di pomodoro, omologo al gene *YUC4* di *Arabidopsis* della famiglia multi genica *YUCCA*, codifica per una flavina monoossigenasi attiva nella conversione da triptamina a N-idrossil-triptamina nella via di biosintesi dell'acido-3-indolacetico *Trp*-dipendente (Expósito-Rodríguez et al., 2007). I frutti impollinati di AC presentano un'attivazione della trascrizione del gene con un massimo dopo quattro giorni dall'impollinazione (fig. 3-27), a differenza dei frutti non impollinati (fig. 3-28), confermando il ruolo dell'IAA come uno dei primi segnali nella formazione del frutto (Vivian-Smith et al., 2001; Dorcey et al., 2009; Mariotti et al., 2011). I dati relativi all'espressione del gene *ToFZY* nei frutti del mutante *dgt* mostrano una chiara *up-regulation* in corrispondenza del quarto giorno dall'impollinazione (fig. 3-27). Al contrario nel mutante *entire* è interessante osservare che i livelli di espressione del gene nei primi giorni si mantengono

costantemente bassi e al di sotto di quelli di AC (fig. 3-27). In diversi casi, il controllo del metabolismo dell'IAA passa attraverso la regolazione dei geni *YUCCA* (Zhao et al., 2010; Rizzardi et al., 2011; Zazimalova and Napier, 2003). E' pertanto plausibile credere che le differenze di espressione del gene in *dgt* ed *entire* siano il risultato di una regolazione a *feedback* in cui una minore e una maggiore sensibilità all'auxina ne determini l'induzione o la repressione.

Diverso è il caso relativo all'espressione del gene *ToFZY* nei frutti partenocarpici di *entire*. I dati mostrano chiaramente una diversa regolazione rispetto ai frutti impollinati. In particolare, si osserva un notevole accumulo di trascritti in una fase molto tardiva e compresa fra il sesto e il decimo giorno dall'emasculazione. Sebbene questo dato risulti di difficile interpretazione è interessante osservare che proprio in corrispondenza dell'ottavo giorno si registra anche l'induzione della *GA20ox-1*. Ulteriori indagini più approfondite potrebbero chiarire se fra i due eventi ci possa essere un nesso di causalità.

Molte evidenze sostengono l'ipotesi che l'azione delle auxine nella promozione dello sviluppo dell'ovario sia in parte mediata dalla regolazione del metabolismo delle gibberelline (Serrani et al., 2008; Mariotti et al., 2011). Sulla base di queste affermazioni, ci siamo chiesti se la crescita maggiore dei frutti di *entire* a seguito dell'applicazione di 100 ng/ovario di 4-CPA (fig. 3-10a) fosse in parte dovuta a una maggiore esaltazione del metabolismo gibberellinico. I dati riportano che effettivamente nei frutti del mutante, il trattamento determina un maggior accumulo di gibberelline rispetto ad AC e in modo particolare di  $GA_{19}$ ,  $GA_{20}$  e di  $GA_1$  (fig. 3-6). Il dato trova ulteriore conferma nell'osservazione che, a seguito del trattamento con 4-CPA, l'azione dell'inibitore LAB198999 risulta molto meno efficace nel ridurre la crescita del frutto in *entire* (tab. 3-2). Questo probabilmente a seguito di una maggiore stimolazione del metabolismo delle gibberelline nel mutante che attenua l'effetto dell'inibitore e come dimostrato dai livelli endogeni significativamente superiori maggiori rispetto ad AC (tab. 3-7). I più alti livelli di  $GA_{12}$  ritrovati in AC sarebbero pertanto la conseguenza di una minore capacità di conversione a  $GA_{19}$  e  $GA_{20}$  rispetto al mutante. A differenza di *entire*, i frutti di *dgt* trattati con la stesse concentrazioni di 4-CPA accumulano quantità molto basse di

gibberelline (tab. 3-6) come probabile conseguenza di una relazione quantitativa fra percezione di auxina accumulo di gibberelline nel frutto.

I geni *Aux/IAAs*, *SAURs* e *GH-3* sono considerati *auxin response genes* perché la loro espressione è rapidamente indotta dall'auxina (Abel and Theologis, 1996; Hagen and Guilfoyle, 2002). I fattori di trascrizione *Aux/IAA* agiscono generalmente da repressori dei geni di risposta all'auxina (Dharmasiri and Estelle, 2004). La famiglia dei geni *SAURs* (*Small Auxin Up Regulated Genes*) codifica invece per alcuni peptidi la cui funzione risulta tutt'ora ignota ma che potrebbero avere qualche ruolo nel sistema di trasduzione del segnale dell'auxina (Hagen and Guilfoyle, 2002). Molti dei geni appartenenti al gruppo del *GH-3* codificano per alcune IAA-amino sintetasi che intervengono nell'omeostasi dei livelli di acido 3-indolacetico attraverso la coniugazione dell'eccesso di IAA con aminoacidi (Staswick et al., 2005).

La recente identificazione del gene *SITR1* in pomodoro, omologo al gene per il recettore dell'auxina *AtTIR1* di *Arabidopsis*, e del suo ruolo nel controllo della transizione da fiore a frutto, apporta un'ulteriore conferma all'importanza del segnale auxinico nella formazione del frutto (Ren et al., 2011). I nostri dati relativi all'espressione nei frutti impollinati dei geni *Aux/IAA*, *LeSAUR*, e *GH-3* rivelano che esistono differenze nel grado di induzione di questi geni nei diversi genotipi. In modo coerente con quanto finora sostenuto, la parziale insensibilità del *dgt* si manifesta con un ridotto stimolo solo di alcuni dei geni analizzati (fig. 3-29). Questo conferma che *dgt* percepisce l'auxina e che solo una parte della via di trasduzione risulta bloccata (Nebenführ et al., 2000; Balbi and Lomax, 2003). Allo stesso modo, in *entire* la maggiore induzione di *LeIAA2*, *LeIAA3* e *LeIAA16* e la repressione di *LeIAA9* (fig. 3-29) potrebbe indicare che anche in questo caso non tutta la via di trasduzione del segnale risulta alterata.

I dati mostrano chiaramente che il trattamento con l'auxina sintetica 4-CPA ha avuto un effetto di stimolo della trascrizione dei geni *Aux/IAAs* in AC rispetto agli ovari non trattati (fig. 3-30). Questo in parte conferma quanto riportato da Serrani et al. (2008) sebbene questi autori non abbiano osservato alcuna induzione per *LeIAA3* e *LeIAA16*. Il ruolo specifico di ogni singola proteina *Aux/IAA* e la specifica

interazione con gli altri componenti del sistema SCF<sup>TIR1</sup>-Aux/IAA-ARF, rimane tuttavia ancora uno dei punti più oscuri del complesso sistema di trasduzione del segnale auxinico (Kieffer et al., 2010). La risposta all'auxina dipende infatti da un preciso bilancio fra lo stimolo sull'espressione dei geni *Aux/IAAs* e la degradazione delle proteine Aux/IAA, mediati entrambi dall'auxina. Un aumento delle concentrazioni di auxina favorisce sia la degradazione delle proteine Aux/IAA via SCF<sup>TIR1</sup> e il successivo rilascio dei fattori di trascrizione ARF, sia la promozione della trascrizione dei geni *Aux/IAAs* (Benjamins and Scheres, 2008). A questo proposito è plausibile che la mancata attivazione dei geni *Aux/IAAs* nei frutti del mutante *dgt*, in risposta all'applicazione di 4-CPA (fig. 3-30) sia da attribuire alla minore sensibilità del mutante a quelle concentrazioni (Mito and Bennett, 1995; Nebenführ et al., 2000). Al contrario, la maggiore induzione dei geni *LeIAA10*, *LeIAA16* e *LeSAUR* in *entire* rispetto al AC sarebbe da ricollegare ad una maggiore attivazione del segnale auxinico. E' interessante osservare che il livello dell'espressione del gene *LeIAA9* risulta inferiore in *entire*, e sorprendentemente, è l'unico gene la cui espressione non aumenta né per effetto dell'impollinazione né a seguito dei trattamenti (fig. 3-29; fig.3-30). Wang et al. (2005) hanno riportato che una minore quantità di trascritti del gene *LeIAA9* è associata alla formazione del frutto, suggerendo per la proteina IAA9 un ruolo centrale come regolatore negativo. Più recentemente è stato proposto un modello per cui lo sviluppo del frutto avviene grazie alla percezione dell'auxina da parte del recettore SITIR1 che determina la degradazione della proteina IAA9 rilasciando così la trascrizione dei geni ad opera di ARF8 (Ren et al., 2011). Tuttavia non è chiaro il motivo per cui in AC l'auxina, pur inducendo l'espressione del gene, determini comunque la formazione del frutto. A questo proposito è stato suggerito che i livelli di espressione potrebbero non corrispondere agli effettivi livelli di proteina (Serrani et al., 2008) e che il controllo da parte dell'auxina dei livelli di Aux/IAA sia finemente bilanciato da un sistema di interazioni tra lo stimolo della trascrizione da una parte e l'induzione della degradazione dei peptidi dall'altra (Kieffer et al., 2011).

Vriezen et al. (2008), affermano che il segnale auxinico non è modulato dalle gibberelline durante lo sviluppo del frutto. Tuttavia, dai nostri dati è possibile

notare che in presenza di 4-CPA e GA<sub>3</sub> l'effetto di induzione di *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA8*, *LeIAA9*, *LeIAA11* risulta molto inferiore in AC rispetto al solo trattamento con l'auxina sintetica. In *entire* l'effetto dei due ormoni associati sulla repressione dei geni appare ancora più drammatico soprattutto per *LeIAA10*, *LeIAA11* e *LeIAA16* e *LeSAUR* (fig. 3-30). A differenza del solo trattamento con 4-CPA, in *dgt* il trattamento combinato sembra avere un effetto di stimolo su *LeIAA1*, *LeIAA2*, *LeIAA3*, *LeIAA11*, *LeIAA8*, *LeIAA9*, *LeSAUR* a conferma del fatto che nel mutante la risposta all'auxina non è del tutto abolita (Nebenführ et al., 2000; Rice and Lomax, 2000). Da notare inoltre, che in presenza dei due ormoni, si ha un incremento ponderale ed effetti sull'anatomia dei frutti di *dgt* che possono essere spiegati come un effetto additivo dei due ormoni (Serrani et al., 2007a). In questo caso siamo portati a pensare che le gibberelline sopperiscano almeno parzialmente alla minore sensibilità all'auxina favorendone l'attivazione del segnale. Come noto, in *dgt* molte risposte mediate dall'auxina, tra cui l'allungamento degli ipocotili, sono bloccate (Kelly and Bradford, 1986; Rice and Lomax, 2000) (fig. 3-9a). Tuttavia in presenza di epibrassinolide, la risposta al trattamento con IAA sull'allungamento degli ipocotili viene ripristinata nel mutante, suggerendo che la presenza di epiBR compensi la mancata percezione dell'auxina (Park, 1998). Inoltre è stato osservato che in alcuni mutanti di *Arabidopsis* auxino-resistenti come *axr2-1*, *axr3-1* e *shy2-2*, l'applicazione di GA<sub>3</sub> è in grado di ripristinare parzialmente il fenotipo legato all'incapacità di percepire l'auxina (Frigerio et al., 2006). E' noto inoltre che ormoni diversi dall'auxina come brassinosteroidi ed etilene possono influenzare direttamente l'espressione dei fattori Aux/IAA modulando così la risposta dell'auxina (Nakamura et al., 2003; Chaabouni et al., 2009; Lin et al., 2008). E' pertanto plausibile ipotizzare che le gibberelline possano interagire a livello di trasduzione del segnale dell'auxina contribuendo al bilanciamento dell'espressione dei fattori di trascrizione Aux/IAA nel frutto.

## **Ringraziamenti**

*Giunto alla fine di questi tre anni non mi rimane altro che ringraziare tutti coloro che hanno contribuito materialmente e moralmente al compimento di questo lavoro di Tesi.*

*In particolare il mio pensiero è rivolto al Prof. Nello Ceccarelli e al Prof. Piero Picciarelli per il loro incessante incoraggiamento e supporto scientifico. Ringrazio il Dott. Lorenzo Mariotti che ha messo a mia disposizione buona parte del suo tempo e tutta la sua pazienza per insegnarmi a lavorare con ordine e scrupolosità. Ringrazio la Dott.ssa Lara Lombardi per i consigli e l'aiuto prezioso con la parte molecolare del mio lavoro. Ringrazio la Dott.ssa Lucia Giorgetti dell'istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria del CNR di Pisa e il Prof. Paolo Cirri del Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università di Firenze per la squisita accoglienza presso i loro laboratori. E infine un particolare ringraziamento va al mutante diageotropica, perché grazie a lui ho avuto l'occasione di conoscere quella speciale persona della mia vita che è Maria Laura.*

## **Cap. 5**

# **Bibliografia**

- Abel S. and Theologis A.** (1996) – Early genes and auxin action – *Plant Physiology* **111**: 9-17.
- Abel S. and Theologis A.** (2010) – Odyssey of auxin – *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a004572.
- Aubert D., Chevillard M., Dorne A.M., Arlaud G., Herzog M.** (1998) - Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions - *Plant Molecular Biology* **36**: 871–883.
- Balbi V. and Lomax T.** (2003) – Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene – *Plant Physiology* **131**: 186-197.
- Baldet P., Hernould M., Laporte F., Mounet F., Just D., Mouras A., Chevalier C. and Rothan C.** (2006) – The expression of cell proliferating-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants – *Journal of Experimental Botany* **57**: 961-970.
- Bassel G.W., Zielinska E., Mullen R.T. and Bewley J.D.** (2004) – Down-regulation of *DELLA* genes is not essential for germination of tomato, soybean, and Arabidopsis seeds – *Plant Physiology* **136**: 2782-2789.
- Benjamins R. and Scheres B.** (2008) – Auxin: the looping star in plant development - *Annual Review of Plant Biology* **59**: 443-465.
- Ben-Nissan G., Weiss D.** (1996) - The petunia homologue of tomato *gast1*: transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation - *Plant Molecular Biology* **32**: 1067–1074.
- Bensen R.J. and Zeevaart J.A.D.** (1990) - Comparison of *ent*-kaurene synthase 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 – *Journal of Plant Growth Regulation* **9**: 237–242.
- Bisbis B., Delmas F., Joubès J., Sicard A., Hernould M., Inzè D., Mouras A. and Chevalier C.** (2006) – Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors regulate the CDK-cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit – *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 7374-7383.
- Bohner J. and Bangerth F.** (1988) - Cell number size and hormone levels in semiisogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size - *Physiologia Plantarum* **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* - *Physiologia Plantarum* **73**: 348-353.
- Bolle C.** (2004) - The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development - *Planta* **218**: 683–692.
- Breuer C., Ishida T. and Sugimoto K.** (2010) – Developmental control of endocycles and cell growth in plants – *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 654-660.
- Brummell D.A. and Hall J.L.** (1987) - Rapid cellular responses to auxin and the regulation of growth - *Plant Cell Environment* **10**: 523–543.
- Bünger-Kibler S. and Bangerth F.** (1982) - 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 Regulation* **1**: 143-154.

- Catalá C., Rose J.K.C. and Bennett A.B.** (1997) - Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls - *The Plant Journal* **12**: 417-426.
- Catalá C., Rose J.K.C. and Bennett A.B.** (2000) - Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth - *Plant Physiology* **122**: 527-534.
- Catalá C., Rose J.K.C., York W.S., Albersheim P., Darvill A.G. and Bennett A.B.** (2001) - Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls - *Plant Physiology* **127**: 1180-1192.
- Cavallini A., Baroncelli S., Lercari B., Cionini G., Rocca M. and D'Amato F.** (1995) - Effect of light and gibberellic acid on chromosome endoreduplication in leaf epidermis of *Triticum durum* Desf. - *Protoplasma* **186**: 57-62.
- Chaabouni S., Jones B., Delalande C., Wang H., Li Z., Mila I., Frasse P., Latché A., Pech J.C. and Bouzayen M.** (2009) - Sl-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth - *Journal of Experimental Botany* **60**: 1349-1362.
- Cheniclet C., Rong W.Y., Causse M., Frangne N., Bolling L., Carde J. and Renaudin J.** (2005) - Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth - *Plant Physiology* **139**:1984-1994.
- Chevalier C., Nafati M., Mathieu-Rivet E., Bourdon M., Frangne N., Cheniclet C., Renaudin J.P., Gévaudant F. and Hernould M.** (2011) - Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development - *Annals of Botany* (in press) doi:10.1093/aob/mcq257.
- Chow B. and McCourt P.** (2007) - Plant hormone receptors: perception is everything - *Genes & Development* **20**: 1998-2008.
- Coenen C., Bierfreund N., Lüten H., Neuhaus G.** (2002) - Developmental regulation of H<sup>+</sup>ATPase-dependent auxin responses in the diageotropica mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*) - *Physiologia Plantarum* **114**: 461-471.
- Cosgrove D.J.** (2000) - Loosening of plant cell walls by expansins - *Nature* **407**: 321-326.
- Davière J.M., de Lucas M. and Prat S.** (2008) - Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function - *Current Opinion in Genetics & Development* **18**: 295-303.
- de Jong M., Mariani C. and Vriezen W.H.** (2009a) - The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set - *Journal of Experimental Botany* **60**: 1523-1532.
- de Jong M., Wolters-Arts M., Feron R., Mariani C. and Vriezen W.H.** (2009b) - The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SIARF7*) regulates auxin signalling during tomato fruit set and development - *The Plant Journal* **57**: 160-170.
- de Jong M., Wolters-Arts M., García-Martínez J.L., Mariani C. and Vriezen W.H.** (2010) - The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (*SIARF7*) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development - *Journal of Experimental Botany* (in press) doi:10.1093/jxb/erq293.
- De la Fuente J.I., Amaya I., Castillejo C., Sanchez-Sevilla J.F., Quesada M.A., Botella M.A. and Valpuesta V.** (2006) - The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation - *Journal of Experimental Botany* **57**: 2401-2411.

- Delker C., Raschke A. Quint M.** (2008) – Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message – *Planta* **227**: 929-941.
- Desgagné-Penix I. and Sponsel V.M.** (2008) – Expression of *gibberellin 20-oxidase1 (AtGA20ox1)* in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels – *Journal of Experimental Botany* **59**: 2057-2070.
- Dharmasiri N. and Estelle M.** (2004) – Auxin signalling and regulated protein degradation – *Trends in Plant Science* **9**: 302-308.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S. and Estelle M.** (2005) – The F-box protein TIR1 is an auxin receptor – *Nature* **435**: 441-445.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Jones A.M. and Estelle M.** (2003) – Auxin action in a cell-free system – *Current Biology* **13**: 1418-1422.
- Dill A. and Sun T.** (2001) – Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana* – *Genetics* **159**: 777-785.
- Dill A., Jung H.S. and Sun T.** (2001) – The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA - *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 14162-14167.
- Dill A., Thomas S.G., Hu J., Steber C.M. and Sun T.** (2004) – The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signalling repressor for gibberellin-induced degradation – *The Plant Cell* **16**: 1392-1405.
- Doležel J., Greilhuber J. and Suda J.** (2007) – Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry – *Nature Protocol* **2**: 2233-2244.
- Dorcey E., Urbez C., Blásquez M.A., Carbonell J. and Perez-Amador M.A.** (2009) – Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis* – *The Plant Journal* **58**: 318-332.
- Ehlert B., Schöttler M.A., Tischendorf G., Ludwig-Müller J. and Bock R.** (2008) – The paramutated *SULFUREA* locus of tomato is involved in auxin biosynthesis - *Journal of Experimental Botany* **59**: 3635-3647.
- Elliott R.C., Ross J.J., Smith J.J., Lester D.R. and Reid J.B.** (2001) – Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea – *Journal of Plant Growth Regulation* **20**: 87-94.
- Epstein E., Cohen J.D. and Slovin J.P.** (2002) – The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development – *Plant Growth Regulation* **38**: 15-20.
- Expósito-Rodríguez M., Borges A.M., Borges-Pérez A., Hernández M. Pérez J.A.** (2007) – Cloning and biochemical characterization of *ToFZY*, a tomato gene encoding a Flavin-Monooxygenase involved in a Tryptophan-dependent auxin biosynthesis pathway – *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 329-340.
- Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G.L. and Spena A.** (1999) – Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato – *Molecular Breeding* **5**: 463-470.
- Fos M., Nuez F. and García-Martínez, J.L.** (2000) - The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries – *Plant Physiology* **122**: 471-480.

- Fos M., Proaño K., Nuez F. and García-Martínez, J.L.** (2001) - Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia Plantarum* **111**: 545-550.
- Frankland B. and Wareing P.F.** (1960) - Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings - *Nature* **185**: 255-256.
- Frigerio M., Alabadí D., Peter-Gomez J., García-Carcél L., Phillips A.L., Hedden P. and Blázquez M.A.** (2006) - Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis - *Plant Physiology* **142**, 553-563.
- Fu F.Q., Mao W.H., Shi K., Zhou Y.H. and Yu J.Q.** (2009) - Spatio-temporal changes in cell division, endoreduplication and expression of cell cycle-related genes in pollinated and plant growth substances-treated ovaries of cucumber - *Plant Biology* **12**: 98-107.
- Fujino D.W., Nissen S.J., Jones A.D., Burger D.W. and Bradford K.J.** (1988) - Quantification of indole-3-acetic acid in dark-grown seedlings of the *diageotropica* and *epinastic* mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - *Plant Physiology* **88**: 731-740.
- Gendrau E., Orbovic V., Höfte H. and Traas J.** (1999) - Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl - *Planta* **209**: 513-516.
- Gibson R.A., Schneider E.A. and Wightman F.** (1972) - Biosynthesis and metabolism of indol-3yl-acetic acid: II. IN VIVO EXPERIMENTS WITH <sup>14</sup>C-LABELLED PRECURSORS OF IAA IN TOMATO AND BARLEY SHOOTS - *Journal of Experimental Botany* **23**: 381-399.
- Gillaspy G., Ben-David H. and Grissem W.** (1993) - Fruit: a development perspective - *Plant Cell* **5**: 1439-1451.
- Goetz M., Hooper L.C., Johnson S.D., Rodrigues J.C.M., Vivian-Smith A. and Koltunow A.M.** (2007) - Expression of aberrant forms of *auxin response factor8* stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato - *Plant Physiology* **145**: 351-366.
- Goetz M., Vivian-Smith A., Johnson S.D. and Koltunow A.M.** (2006) - *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis - *The Plant Cell* **18**: 1873-1886.
- Gonzalez N., Hernould M., Delmas F., Gévaudant F., Duffe P., Causse M., Mouras A. and Chevalier C.** (2005) - Molecular characterization of a *WEE1* gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - *Plant Molecular Biology* **56**: 849-861.
- Gonzalez N., Gévaudant F., Hernould M., Chevalier C. and Mouras A.** (2007) - The cell cycle-associated protein kinase *WEE1* regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit - *The Plant Journal* **51**: 642-655.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O. and Estelle M.** (2001) - Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup> - dependent degradation of Aux/IAA proteins - *Nature* **414**: 271-276.
- Griffiths J., Murase K., Rieu I., Zentella R., Zhang Z., Powers S.J., Gong F., Phillips A.L., Hedden P., Sun T. and Thomas S.G.** (2006) - Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in Arabidopsis - *The Plant Cell* **18**: 3399-3414.
- 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 - *Physiologia Plantarum* **71**: 184-190.
- Guilfoyle T. J. and Hegen G.** (2007) - Auxin response factors - *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 453-460.

- Guo J., Kwon H.K. and Wang M.H.** (2010) - Characterization of three A-type cyclin genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) treated with auxins - *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **53**: 266-274.
- Hagen G. and Guilfoyle T.** (2002) – Auxin responsive gene expression: genes, promoters, regulatory factors – *Plant Molecular Biology* **49**: 373-385.
- Hamamoto H., Shisido Y., Furuya S. and Yasuba K.I.** (1998) – Growth and development of tomato fruit as affected by 2,3,5-Triiodobenzoic acid (TIBA) applied to the peduncle – *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* - **67**: 210-212.
- Hay A., Kaur H., Phillips A., Hedden P., Hake S. and Tsiantis M.** (2002) - The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans - *Current Biology* **12**:1557–1565.
- Hedden P.** (2008) – Gibberellins close the lid – *Nature* **456**: 455-456.
- Hedden P. and Phillips A.L.** (2000) – Gibberellin metabolism. New insight revealed by the genes – *Trends in Plant Science* **5**: 523-530.
- Ishida T., Adachi S., Yoshimura M., Shimizu K., Umeda M. and Sugimoto K.** (2010) – Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in Arabidopsis – *Development* **137**: 63-71.
- Jackson M.B.** (1979) – Is the diageotropic tomato ethylene deficient? – *Physiologia Plantarum* **46**: 347-351.
- Jasinski S., Tattersall A., Piazza P., Hay A., Martinez-Garcia J.F., Schmitz G., Theres K., McCormick S. and Tsiantis M.** (2008) – *PROCERA* encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato – *The Plant Journal* **56**: 603-612.
- Jiang C. and Fu X.** (2007) – GA action: turning on de-DELLA repressing signalling – *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 461-465.
- Jones M.G.** (1987) – Gibberellins and the *procera* mutant of tomato – *Planta* **172**: 280-284.
- Joubès J. and Chevalier C.** (2000) – Endoreduplication in higher plants – *Plant Molecular Biology* **43**: 735-745.
- Joubès 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 Physiology* **121**: 857-869.
- Joubès J., Walsh D., Raymond P. and Chevalier C.** (2000) – Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit – *Planta* **211**: 430-439.
- 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., Yashiro Y., Habu T., Sunamoto K. and Kitajima A.** (2009) – The addition of gibberellic acid to auxin solutions increases sugar accumulation and sink strength in developing auxin-induced parthenocarpic tomato fruits – *Scientia Horticulturae* **123**: 228-233.

- Kelly M.O. and Bradford K.J.** (1986) – Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin - *Plant Physiology* **82**: 713-717.
- Kieffer M., Neve J. and Kepinski S.** (2010) – Defining auxin response contexts in plants development – *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 12-20.
- Kondorosi E., Roudier F. and Gendrau E.** (2000) – Plant cell-size control: growing by ploidy? – *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 488-492.
- 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 - *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **69**: 171-179.
- 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 Physiology* **139**: 750-769.
- Lin Z., Arciga-Reyes L., Zhong S., Alexander L., Hachett R., Wilson I. and Grierson D.** (2008) – SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development - *Journal of Experimental Botany* **59**: 4271-4287.
- Liscum E. and Reed J.W.** (2002) – Genetics of AUX/IAA and ARF action in plant growth and development – *Plant Molecular Biology* **49**: 387-400.
- 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 Physiology* **19**: 1281-1288.
- Mariotti L., Picciarelli P., Lombardi L. and Ceccarelli N.** (2011) – Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin and bioactive gibberellin contents – *Journal of Plant Growth Regulation* (in press)
- Martí C., Orzáez D., Ellul P., Moreno V. and Granell A.** (2007) – Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits – *The Plant Journal* **52**: 865-876.
- Martí E., Carrera E., Ruiz-Rivero O. and García-Martínez J.L.** (2010) – Hormonal regulation of tomato gibberellin 20-oxidase1 expressed in Arabidopsis – *Journal of Plant Physiology* **167**: 1188-1196.
- Mathieu-Rivet E., Gévaudant F., Sicard A., Salar S., Do P.T., Mouras A., Fernie A.R., Gibon Y., Rothan C., Chevalier C. and Hernould M.** (2010) – Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato – *The Plant Journal* **62**: 727-741.
- Matsushita A., Furumoto T., Ishida S. and Takahashi Y.** (2007) – AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox-1* encoding GA 3-oxidase – *Plant Physiology* **143**: 1152-1162.
- May C., Steffens B., Schenk D. and Lüthen H.** (2003) – The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor – *Planta* **218**: 309-314.
- Meir S., Philosoph-Hadas S., Sundaresan S., Selvaraj K.S.V., Burd S., Ophir R., Kochanek B., Reid M.S., Jiang C.Z. and Lers A.** (2010) – Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion – *Plant Physiology* **154**: 1929-1956.

- Middleton A.M., King J.R., Bennett M.J. and Owen M.R.** (2010) – Mathematical modelling of the *Aux/IAA* negative feedback loop – *Bulletin of Mathematical Biology* **72**: 1383-1407.
- Mito N. and Bennett A.B.** (1995) - The *diageotropica* mutation and the synthetic auxins differentially affect expression of auxin-regulated genes in tomato - *Plant Physiology* **109**: 293-297.
- Mockaitis and Estelle** (2008) – Auxin receptor and plant development: a new signaling paradigm - *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**: 55-80.
- Molesini B., Pandolfini T., Rotino G.L., Dani V. and Spena A.** (2009) - *Aucsia* gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato – *Plant Physiology* **149**: 534-548.
- Murase K., Hirano Y., Sun T. and Hakoshima T.** (2008) – Gibberellin-induced DELLA protein recognition by the gibberellin receptor GID1 – *Nature* **456**: 459-464.
- Nafati M., Cheniclet C., Hernould M., Do P.T., Fernie A.R., Chevalier C. and Gévaudant F.** (2011) – The specific overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth – *The Plant Journal* **65**: 543-556.
- Nakamura A., Higuchi K., Goda H., Fujiwara M.T., Sawa S., Koshiba T., Shimada Y. and Yoshida S.** (2003) – Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19* and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signalling – *Plant Physiology* **133**: 1843-1853.
- Nakjima M., Shimada A., Takashi Y., Kim Y., Park S., Ueguchi-Tanaka M., Suzuki H., Katoh E., Iuchi S., Kobayashi M., Maeda T., Matsuoka M. Hsing and Yamaguchi I.** (2006) – Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors – *The Plant Journal* **46**: 880-889.
- Nebenführ A., White T.J. and Lomax T.** (2000) – The *diageotropica* mutation alters auxin induction of a subset of the *Aux/IAA* gene family in tomato – *Plant Molecular Biology* **44**: 73-84.
- Nishio S., Moriguchi R., Ikeda H., Takahashi H., Takahashi H., Nobuharu F., Guilfoyle T.J., Kanahama K. and Kanayama Y.** (2010) - Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development – *Planta* **232**: 755-764.
- O'Neill D.P. and Ross J.J.** (2002) – Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea – *Plant Physiology* **130**: 1974-1982.
- O'Neill D.P., Davidson S.E., Clarke V.C., Yamauchi Y., Yamaguchi S., Kamiya Y., Reid J.B. and Ross J.J.** (2010) – Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins – *Planta* **232**: 1141-1149.
- Oh K.C., Ivanchenko M.G., White T.J. and Lomax T.L.** (2006) – The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclopilin: a novel player in auxin signalling – *Planta* **224**: 133-144.
- Olimpieri I., Caccia R., Picarella M.E., Pucci A., Santangelo E., Soressi G.P. and Mazzucato A.** (2010) – Constitutive co-suppression of the *GA 20-oxidase 1* gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development – *Plant Science* (in press) doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.004.

- Olimpieri I., Siligato F., Caccia R., Mariotti L., Ceccarelli N., Soressi G.P. and Mazzucato A.** (2007) – Tomato fruit set driven by pollination or by the *parthenocarpic fruit* allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis – *Planta* **226**: 877-888.
- Ozga A.J. and Reineke D.M.** (2003) – Hormonal interaction in fruit development – *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 73-81.
- Ozga J., Reinecke D.M., Ayele B.T., Ngo P., Nadeau C. and Wickramaratna D.** (2009) – Developmental and hormonal regulation of gibberellin biosynthesis and catabolism in pea fruit – *Plant Physiology* **150**: 448-462.
- Ozga J.A., Yu J. and Reinecke D.M.** (2003) – Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 $\beta$ -Hydroxylase gene expression in pea fruit and seed – *Plant Physiology* **131**: 1137-1146.
- Pandolfini T., Molesini B. and Spena A.** (2007) – Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation – *Trends in Plant Science* **12**: 327-329.
- Pandolfini T., Rotino G.L., Camerini S., Defez R. and Spena A.** (2002) - Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes - *BMC Biotechnology* **2**: 1.
- Park W.J.** (1998) – Effect of epibrassinolide on hypocotyl growth of the tomato mutant *diageotropica* – *Planta* **207**: 120-124.
- Perrot-Rechenmann C.** (2010) – Cellular response to auxin: division versus expansion - *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**:a001446.
- Quint M. and Gray W.** (2006) – Auxin signaling – *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 448-453.
- Rademacher W.** (2000) – Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways – *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 501-531.
- Rebers M., Kaneta T., Kawaide H., Yamaguchi S., Yang Y.Y., Imai R., Sekimoto H. and Kamiya Y.** (1999) - Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato – *The Plant Journal* **17**: 241-250.
- Reed J.W.** (2001) – Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis* – *Trends in Plant Science* – **6**: 420-425.
- Ren Z., Li Z., Miao Q., Yang Y., Deng W. and Hao Y.** (2011) – The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphology – *Journal of Experimental Botany* (in press) doi:10.1093/jxb/erq455.
- Rice M.S. and Lomax T.L.** (2000) – The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway – *Planta* **210**: 906-913.
- Rice M.S. and Lomax T.L.** (2000) – The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway – *Planta* **210**: 906-913.
- Rizzardi K., Landberg K., Nilsson L., Ljung K. Sundås-Larsson** (2011) – *TFL2/LHP1* is involved in auxin biosynthesis through positive regulation of *YUCCA* genes – *The Plant Journal* (in press) doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04470.x.

- Rodríguez M.E., Borges A., Borges-Perez A., Hernandez M. and Perez J.A.** (2007) – Cloning and biochemical characterization of *ToFZY*, a tomato gene encoding a flavin monooxygenase involved in a tryptophan-dependent auxin biosynthesis pathway – *Journal of Plant Growth and Regulation* **26**: 329-340.
- Romano P., Gray J., Horton P. and Luan S.** (2005) – Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation – *New Phytologist* **166**: 753-769.
- Santes C.M. and García-Martínez J.L.** (1995) - Effect of the growth retardant 3,5-dioxo-4-butyryl-cyclohexane carboxylic acid ethyl ester, an acylcyclohexanedione compound, on fruit growth and gibberellin content of pollinated and unpollinated ovaries in pea – *Plant Physiology* **108**: 517-523.
- Schwechheimer C.** (2008) – Understanding gibberellic acid signalling: are we there yet? – *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 9-15.
- Serrani J.C., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Gallego-Giraldo L., Peres L.E.P. and García-Martínez J.L.** (2010) – Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in tomato mediated by gibberellins – *Plant Physiology* **153**: 851-862.
- Serrani J.C., Fos M., Atarés A. and García-Martínez J.L.** (2007a) – Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv Micro-tom of tomato – *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 211-221.
- Serrani J.C., Ruiz-Rivero O., Fos M. and García-Martínez J.L.** (2008) – Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins – *The Plant Journal* **56**: 922-934.
- Serrani J.C., Sanjuán R., Ruiz-Rivero O., Fos M. and García-Martínez J.L.** (2007b) – Gibberellin Regulation of Fruit set and growth in tomato – *Plant Physiology* **145**: 246-257.
- Shi L., Gast R.T., Gopalraj M. and Olszewski N.E.** (1992) – Characterization of a shoot-specific, GA<sub>3</sub> and ABA-regulated gene from tomato – *The Plant Journal* **2**: 153-159.
- Shimada A., Ueguchi-Tanaka M., Nakatsu T., Nakajima M., Naoe Y., Ohmiya H., Kato H., and Matsuoka M.** (2008) - Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1* – *Nature* **456**: 520-524.
- Silverstone A.L., Jung H.S., Dill A., Kawaide H., Kamiya Y. and Sun T.** (2001) – Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis* – *The Plant Cell* **13**: 1555-1565.
- Srivastava A. and Handa A.K.** (2005) – Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective – *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 67-82.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C. and Suza W.** – (2005) – Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid – *The Plant Cell* **17**: 616-627.
- Sugimoto-Shirasu K. and Roberts K.** (2003) – “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants - *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 544-553.
- Swain S.M. and Singh D.P.** (2005) – Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development – *Trends in Plant Science* **10**: 123-129.
- Szemenyei H., Hannon M. and Long J.A.** (2008) – TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis – *Science* **319**: 1384-1386.

- Tan X., Calderon-Villalobos L.I.A., Sharon M., Zheng C., Robinson C.V., Estelle M. and Zheng N.** (2007) – Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase – *Nature* **446**: 640-645.
- Thomas S.G., Phillips A.L. and Hedden P.** (1999) – Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidase, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 4698-4703.
- Tiwari S.B., Hagen G. and Guilfoyle T.J.** (2003) – The roles of auxin factor domains in auxin-responsive transcription – *The Plant Cell* **15**: 533-543.
- Tiwari S.B., Hagen G. and Guilfoyle T.J.** (2004) – Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain – *The Plant Cell* **16**: 533-543.
- Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Chow T., Hsing Y.C., Kitano H., Yamaguchi I. and Matsuoka M.** (2005) – *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin – *Nature* **437**: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Katoh E., Ohmiya H., Asano K., Saji S., Hongyu X., Ashikari M., Kitano H., Yamaguchi I. and Matsuoka M.** (2007) – Molecular interaction of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin – *The Plant Cell* **19**: 2140-2155.
- Ulmasov T., Murfet J., Hagen G. and Guilfoyle T.J.** (1997) – Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements – *The Plant Cell* **9**: 1963-1971.
- Van Tuinen A., Peters A.H.L.J., Kendrick R.E., Zeevart J.A.D. and Koornneef M.** (1999) – Characterization of the *procera* mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatment – *Physiologia Plantarum* **106**: 121-128.
- Vanneste S. and Friml J.** (2009) – Auxin: a trigger for change in plant development – *Cell* **136**: 1005-1016.
- Vivian-Smith A., Luo M., Chaudhury and Koltunow** (2001) – Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis – *Development* **128**: 2321-2331.
- Vriezen W.H., Feron R., Maretto F., Keijman J. And Mariani C.** (2007) – Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation on fruit set – *New Phytologist* **177**: 60-76.
- Wang H., Jones B., Li Z., Frasse P., Delalande C., Regad F., Chaabouni S., Latché A., Pech J.C. and Bouzayen M.** (2005) – The tomato transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis – *The Plant Cell* **17**: 2676-2692.
- Wang H., Shauer N., Usadel B., Frasse P., Zouine M., Hernould M., Latché A., Pech J.C., Fernie A.R. and Bouzayen M.** (2009) – Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling – *The Plant Cell* **21**: 1428-1452.
- Wang P. and Heitman J.** (2005) – The cyclophilins – *Genome Biology* **6**: 226-231.
- Weigel D., Ahn J.H., Blázquez M.A., Borevitz J.O., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M., Nguyen J.T., Sato S., Wang Z.Y., Xia Y, Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., Yanofsky M.F. and Chory J.** (2000) – Activation tagging in Arabidopsis – *Plant Physiology* **122**: 1003-1013.

- Wittwer S.H., Bukovac M.J., Sell H.M. and Weller L.E.** (1957) – Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting – *Plant Physiology* **32**: 39-41.
- Woodhead M., Jupe S.C. and Scott I.M.** (1997) – The pro gene causes an enhanced cell expansion response to fusaric acid in tomato – *Journal of Plant Growth Regulation* **16**: 69-71.
- Woodward A.W. and Bartel B.** (2005) – Auxin: regulation, action, and interaction – *Annals of Botany* **95**: 707-735.
- Xiao J., Li H., Zhang J., Chen R., Zhang Y., Ouyang B., Wang T. and Ye Z.** (2006) – Dissection of GA 20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing – *Plant Growth Regulation* **50**: 179-189.
- Yamaguchi S.** (2008) – Gibberellin metabolism and its regulation – *Annual Review of Plant Biology* **59**: 225-251.
- Zhang J., Cheng R., Xiao J., Quian C., Wang T., Li H., Ouyang B. and Ye Z.** (2007) – A single-base deletion mutation in *SlIAA9* gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutation – *Journal of Plant Research* **120**: 671-678.
- Zhao Y.** (2010) – Auxin biosynthesis and its role in plant development – *Annual Review of Plant Biology* **61**: 49-64.
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D. and Chory J.** (2001) – A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis – *Science* **291**: 306-309.
- Zazimalova E. and Napier R.M.** (2003) – Points of regulation for auxin action – *Plant Cell Reports* **21**: 625-634.
- Zimmermann R., Sakai H. and Hochholdinger F.** (2010) – The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development – *Plant Physiology* **152**: 356-365.
- Zobel R.W.** (1973) – Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant *diageotropica* – **52**: 385-389.