

Dottorato di ricerca in Biologia vegetale -3°ANNO- XXI ciclo
Università della Calabria- Dipartimento di Ecologia
CR ENEA- Sezione Biotec-Gen

**Sequenziamento massivo 454 ed identificazione di
geni candidati nell'espressione di caratteri
qualitativi nel frutto**

Coordinatore

Prof. Aldo Musacchio

Dottoranda

Laura Torchia

Tutor

Dott. Gaetano Perrotta

1. Introduzione

Per rispondere ad un ambiente continuamente variabile le piante, dai muschi alle angiosperme, hanno evoluto la capacità di produrre una straordinaria varietà di metaboliti secondari. A tali composti sono attribuite molteplici e rilevanti funzioni biologiche. Specifiche classi di polifenoli, come i flavonoidi, comprendono composti colorati responsabili della pigmentazione di fiori e frutti, essenziale per attrarre gli insetti impollinatori e i parassiti che, nutrendosi dei frutti, favoriscono la dispersione dei semi. Altri composti fenolici agiscono come molecole segnale nelle interazioni simbiotiche pianta-microorganismo di tipo mutualistico, o in difesa contro i microrganismi patogeni e le radiazioni ultraviolette (Schijlen et al., 2004). I polifenoli, inoltre, contribuiscono notevolmente alle caratteristiche organolettiche dei frutti, come l'aroma ed il sapore, importanti per la qualità e la commerciabilità di questi alimenti (Botia et al., 2001; Schwab and Raab, 2004).

Studi epidemiologici e saggi *in vitro* ed *in vivo* attestano che vitamine, carotenoidi e polifenoli, assunti con la dieta, agiscono da preziosi antiossidanti naturali, proteggendo dalle malattie cardiovascolari e da alcune forme di cancro (Pietta et al., 2000; Tuck and Hayball, 2002). In virtù di simili effetti benefici per la salute umana, l'accumulo di antiossidanti conferisce un valore aggiunto alla qualità ed alle proprietà nutrizionali dei frutti. La composizione dei frutti in metaboliti secondari antiossidanti, pertanto, ha attratto in maniera sempre più evidente, l'interesse della ricerca scientifica nel settore farmacologico e delle biotecnologie agroalimentari. L'identificazione dei geni strutturali e regolatori coinvolti nelle *pathway* che presiedono alla biosintesi di tali composti già da alcuni anni rappresenta un target di ricerca di grande importanza per l'applicazione di strategie mirate al miglioramento qualitativo delle specie da frutto di maggior interesse economico. I processi di regolazione a monte di tali vie biosintetiche coinvolgono sia fattori molecolari endogeni (geni regolatori, fattori di trascrizione, ormoni) che fattori ambientali (luce, temperatura, stress biotici e abiotici). Dati sperimentali recenti dimostrano che la capacità genetica di fotopercezione delle piante esercita

un'influenza positiva sull'accumulo di metaboliti antiossidanti a livello di foglie, germogli e frutti (Giliberto et al., 2003; Zhang et al., 2006; Chatterjee et al., 2006; Vandenbussche et al., 2007; Jaakola et al., 2004). In pomodoro, *Arabidopsis* e mirtillo, in particolare, l'accumulo di tali composti è risultato strettamente correlato all'espressione ed al corredo dei geni per i criptocromi (CRY), una classe di fotorecettori della luce blu, protagonisti di importanti risposte fotomorfogenetiche nelle piante (Giliberto et al., 2003; Wade et al., 2001; Jaakola et al., 2004; Vandenbussche et al., 2007).

1.1 Olivo e metaboliti secondari.

L'olivo, *Olea europaea* L., appartiene alla famiglia delle *Oleaceae*, che comprende 23 generi. All'interno del genere *Olea* vi sono 35 specie; la più importante è l'*Olea europaea*, che è divisa in due sottospecie, delle quali una, la *O. europaea europaea* (o anche var. *sativa*) è quella coltivata, l'altra, la *O. europaea sylvestris* (già conosciuta come *Olea oleaster*) è il tipo selvatico, diffuso sulle coste meridionali del Mediterraneo.

Il frutto è una drupa, solitamente di forma ovoidale, può pesare da 2-3 gr per le cultivar da olio fino a 4-5 gr nelle cultivar da tavola. La drupa consiste di un pericarpo carnoso ed un endocarpo legnoso, all'interno del quale è racchiuso il seme. Il pericarpo si suddivide, a sua volta, in un epi- o esocarpo esterno (la buccia), il cui colore varia dal verde al violaceo a seconda delle diverse *cultivar*, ed un mesocarpo interno polposo, che contiene il 25-30 % di olio, raccolto all'interno delle sue cellule sottoforma di piccole goccioline. L'endocarpo legnoso, che contiene il seme, è anch'esso ovoidale, ruvido e di colore marrone.

Le olive e l'olio d'oliva, che fanno parte integrante della dieta mediterranea, sono notoriamente riconosciuti come sorgenti ricche di antiossidanti naturali, che includono tocoferoli e polifenoli. Alcune classi di polifenoli identificati nel frutto e nell'olio d'oliva risultano particolarmente interessanti in quanto prevengono gravi patologie umane (neoplasie e cardiopatie) ed incrementano la qualità e la stabilità

ossidativa dell'olio d'oliva. Le proprietà salutari di questi composti sono correlate alla loro capacità di “scavenging” dei radicali liberi, responsabili di reazioni di perossidazione lipidica causa primaria dell'aterosclerosi, nonché del deterioramento delle proprietà sensoriali (“flavor”, aroma, colore) e nutrizionali dell'olio d'oliva.

Il composto fenolico più abbondante nella drupa è l'oleuropeina (Fig. 1), che nelle olive verdi immature può raggiungere concentrazioni superiori al 14% del peso fresco.

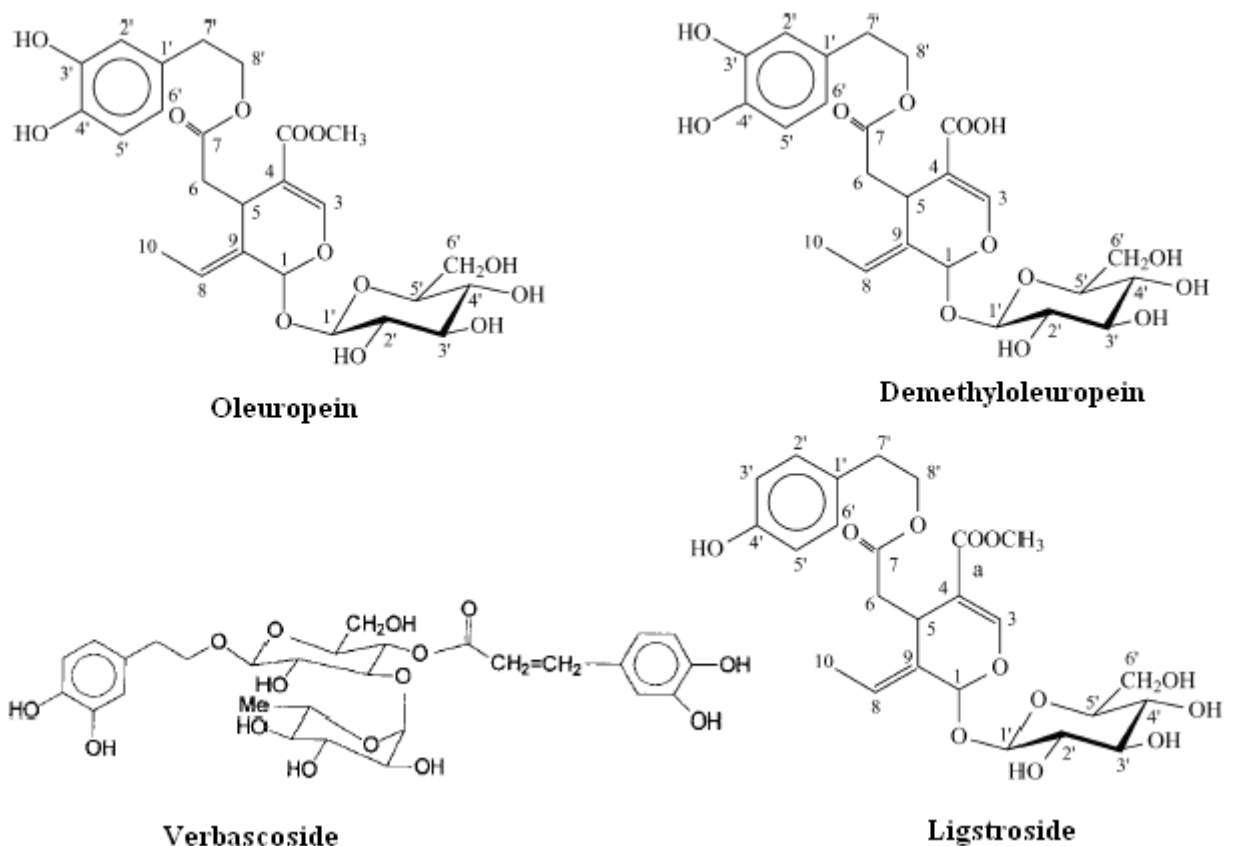


Fig. 1: Struttura chimica dei principali oleosidi presenti nel mesocarpo della drupa di olivo.

L'oleuropeina appartiene alla classe dei secoiridoidi glicosidi, polifenoli presenti esclusivamente in specie appartenenti alla famiglia delle Oleaceae e derivati dal metabolismo secondario dei terpeni, a partire dal mevalonato come precursore, secondo una via biosintetica non ancora del tutto conosciuta (Fig. 2; Soler-Rivas et al., 2000).

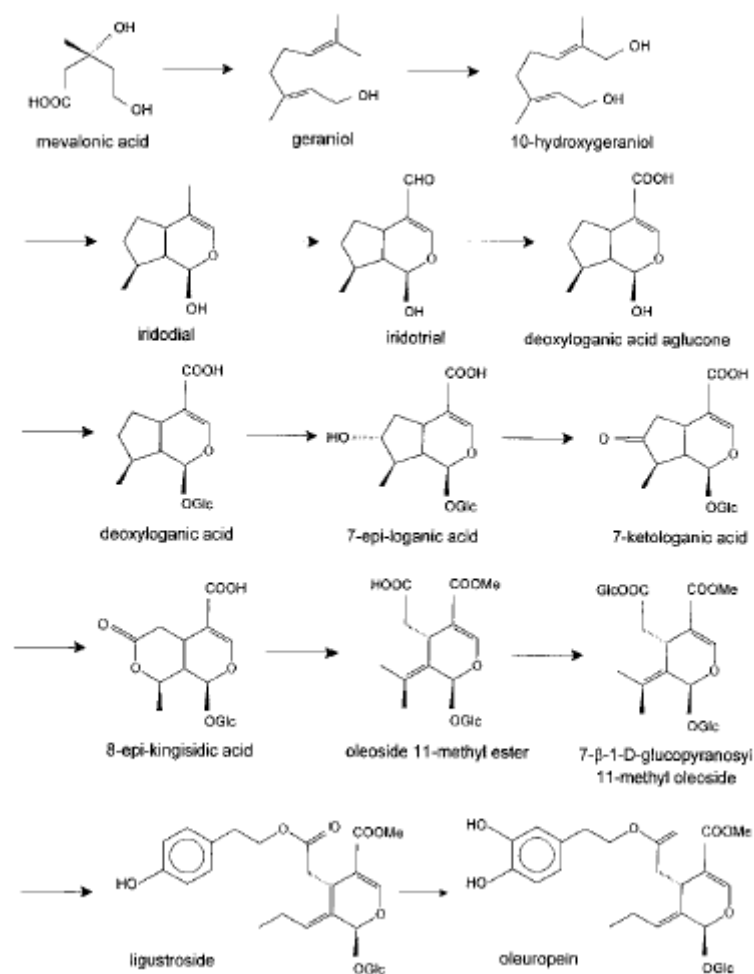


Fig. 2: Pathway proposta per la biosintesi dell'oleuropeina nelle Oleaceae (Soler-Rivas et al., 2000).

Altri polifenoli glicosidi (anche chiamati “oleosidi”) presenti nel frutto di olivo sono il ligustroside, il verbascoside, la dimetiloleuropeina, il nuzenide (solo all'interno del seme) ed altri derivati dell'oleuropeina a minor peso molecolare, come l'idrossitirosolo ed il tirosolo (Fig. 1; Tab. 1; Soler-Rivas et al., 2000). Tra i polifenoli presenti nelle olive, oltre ai secoiridoidi glicosidi, figurano anche acidi ed alcoli fenolici, flavonoidi (Tab. 1; Servili and Montedoro, 2002). I flavonoidi più rappresentati sono i flavonoli, i flavoni glicosidi e le antocianine, prevalentemente cianidina e delphinidina glicosidi (Tab. 1; Servili and Montedoro, 2002).

La composizione fenolica nei frutti di olivo dipende dalla varietà, dalle pratiche agronomiche, dallo stadio di maturazione, dal tessuto e da fattori ambientali (per es. temperatura, disponibilità d'acqua). A seconda dallo stadio di maturazione del frutto,

The main phenolic compounds of olive fruit

Anthocyanins
Cyanidin-3-glucoside
Cyanidin-3-rutinoside
Cyanidin-3-caffeyglucoside
Cyanidin-3-caffeylaltinoside
Delphinidin 3-rhamosylglucoside-7-xyloside
Flavonols
Quercetin-3-rutinoside
Flavones
Luteolin-7-glucoside
Luteolin-5-glucoside
Apigenin-7-glucoside
Phenolic acids
Chlorogenic acid
Caffeic acid
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
Protocatechuic acid
Vanillic acid
Syringic acid
<i>p</i> -Coumaric acid
<i>o</i> -Coumaric acid
Ferulic acid
Sinapic acid
Benzoic acid
Cinnamic acid
Gallic acid
Phenolic alcohols
(3,4 Dihydroxyphenyl) ethanol (3,4-DHPEA)
(<i>p</i> -Hydroxyphenyl) ethanol (<i>p</i> -HPEA)
Secoindoids
Oleuropein
Demethyloleuropein
Ligstroside
Nuzhenide
Hydroxycinnamic acid derivatives
Verbascoside

Tab. 1: I principali composti fenolici del frutto di olivo (Servili and Montedoro, 2002).

in particolare, le concentrazioni fenoliche variano dall'1% al 3% del peso fresco di polpa (Soler-Rivas et al., 2000). Il processo di maturazione della drupa di olivo inizia dopo una fase di crescita, che avviene durante 6-8 mesi successivi alla fioritura (Ryan et al., 1999). In questa fase, il frutto, raggiunge la sua dimensione finale mantenendo il colore verde della buccia ed accumula lipidi ed oleuropeina (che raggiunge il 14% del peso secco del frutto) (Soler-Rivas et al., 2000). Segue una fase di "maturazione verde", in cui le concentrazioni di clorofille ed oleuropeina tendono a ridursi in concomitanza con l'ammorbidimento della polpa, l'incremento del contenuto in olio ed in alcuni derivati dell'oleuropeina a minor peso molecolare (dimetiloleuropeina, idrossitirosolo, tirosolo, acido elenolico). Nella terza ed ultima fase, detta di

“maturazione nera”, le clorofille scompaiono e si accumulano progressivamente le antocianine (Soler-Rivas et al., 2000). In base al colore dell’epicarpo del frutto sono stati definiti quattro stadi di sviluppo del frutto: verde, macchiato, viola e nero (García et al., 1996). Nelle olive nere i fenoli prevalenti sono la dimetiloleuropeina, l’idrossitirosolo, il verbascoside e le antocianine (Soler-Rivas et al., 2000).

L’olio d’oliva contiene almeno 30 composti fenolici (Tab. 2). Tali composti appartengono a classi differenti come gli acidi fenolici, gli alcoli fenolici, i flavonoidi, i secoiridoidi ed i lignani (Tab. 2; Servili and Montedoro, 2002).

Phenolic compounds in virgin olive oil
Phenolic acids and derivatives
Vanillic acid
Syringic acid
<i>p</i> -Coumaric acid
<i>o</i> -Coumaric acid
Gallic acid
Caffeic acid
Protocatechuic acid
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
Ferulic acid
Cinnamic acid
4-(Acetoxyethyl)-1,2-dihydroxybenzene
Benzoic acid
Hydroxy-isocromans
Phenolic alcohols
(3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol (3,4 DHPEA)
(<i>p</i> -Hydroxyphenyl)ethanol (<i>p</i> -HPEA)
(3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol-glucoside
Secoiridoids
Dialdehydic form of decarboxymethyl etenolic acid linked to 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA)
Dialdehydic form of decarboxymethyl etenolic add linked to <i>p</i> -HPEA (<i>p</i> -HPEA-EDA)
Oleuropein aglycon (3,4 DHPEA-EA)
Ligstroside aglycon
Oleuropein
<i>p</i> -HPEA-derivative
Dialdehydic form of oleuropein aglycon
Dialdehydic form of ligstroside aglycon
Lignans
(+)-1-Acetoxypinoresinol
(+)-Pinoresinol
Flavones
Apigenin
Luteolin

Tab. 2: I principali composti fenolici dell’olio d’oliva (Servili and Montedoro, 2002).

Le composizioni della drupa e dell’olio d’oliva presentano notevoli differenze dovute ad una serie di alterazioni chimiche ed enzimatiche che avvengono a carico dei polifenoli contenuti nel frutto durante le procedure di estrazione dell’olio (Tab.

2). Tali alterazioni includono l'idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi liberi ad opera di lipasi, l'idrolisi dei glicosidi e degli oligosaccaridi da parte di glucosidasi, che produce agliconi maggiormente liposolubili, l'ossidazione di composti fenolici da parte di fenolossidasi e la polimerizzazione di fenoli liberi (Bouaziz et al, 2005).

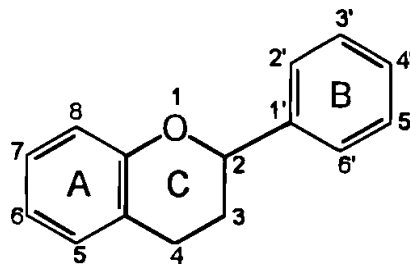
1.2 Fragola

La fragola coltivata (*Fragaria x ananassa* Duch., famiglia delle Rosaceae) è un frutto di popolare consumo, ricco di vitamine ed antiossidanti. E' un falso frutto, che deriva da un allargamento del ricettacolo del fiore, che diventa polposo e succulento allo stadio maturo e contiene i veri frutti o acheni ancorati sulla sua superficie esterna (Schwab and Raab, 2004). Il frutto di fragola cresce rapidamente, raggiungendo la dimensione definitiva in circa 30 giorni dopo l'antesi. Il tempo impiegato per la maturazione è strettamente legato alla temperatura e varia dai 20 ai 60 giorni. La crescita del ricettacolo, successiva alla caduta dei petali, avviene inizialmente mediante divisioni cellulari, responsabili solo del 15-20% della crescita totale. Il frutto si sviluppa, infatti, prevalentemente via espansione cellulare. L'aumento del volume cellulare è accompagnato da profondi cambiamenti strutturali a carico della parete e degli organelli. Le cellule del ricettacolo, infatti, dopo l'antesi hanno parete spessa, granuli di amido all'interno dei plastidi, numerosi ribosomi ed un esteso apparato di Golgi. Durante lo sviluppo del frutto, aumenta il contenuto di acqua nelle cellule, la parete si rigonfia, aumenta la solubilità dei componenti della lamella mediana e della matrice, i plastidi perdono i granuli di amido. Le modificazioni strutturali della parete cellulare sono causa del "softening", ossia del decremento di consistenza del frutto. Nel frutto maturo, costituito per il 90% di acqua, il volume cellulare è occupato sostanzialmente dal vacuolo, contenente acidi organici, zuccheri e composti fenolici, mentre il citoplasma è ridotto ad un sottile strato compresso tra il tonoplasto e la parete (Schwab and Raab, 2004).

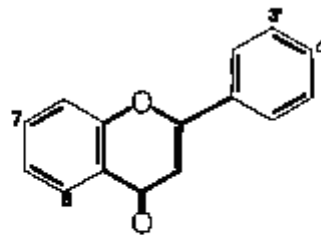
Le modificazioni subite dalle strutture subcellulari durante lo sviluppo del frutto sono accompagnate da cambiamenti biochimico-molecolari che coinvolgono

enzimi associati al metabolismo dei carboidrati, della parete cellulare e dei pigmenti. Questi ultimi si accumulano all'interno del vacuolo cellulare nel corso della maturazione, funzionando da indicatori naturali del grado di maturità del frutto. L'attraente colore rosso porpora del frutto maturo si deve prevalentemente alle antocianine, pigmenti fenolici appartenenti alla classe dei flavonoidi (Schwab and Raab, 2004). Dal punto di vista chimico, i flavonoidi sono polifenoli a basso peso molecolare, caratterizzati da uno scheletro di base, costituito da due anelli aromatici a sei atomi di carbonio (anelli A e B, Fig. 3A), interconnessi da un terzo anello eterociclico a tre atomi di carbonio (anello C, Fig. 3A; Pietta, 2000). In base al livello di ossidazione ed al pattern di sostituzione dell'anello C, distinguiamo varie sottoclassi di flavonoidi, tra le quali flavoni, flavanoni, isoflavoni, flavonoli, flavanoli e antocianine (Fig. 3B; Pietta, 2000).

A



B



Flavones

	5	7	3'	4'
luteolin	OH	OH	OH	OH
apigenin	OH	OH		OH
chrysin	OH	OH		

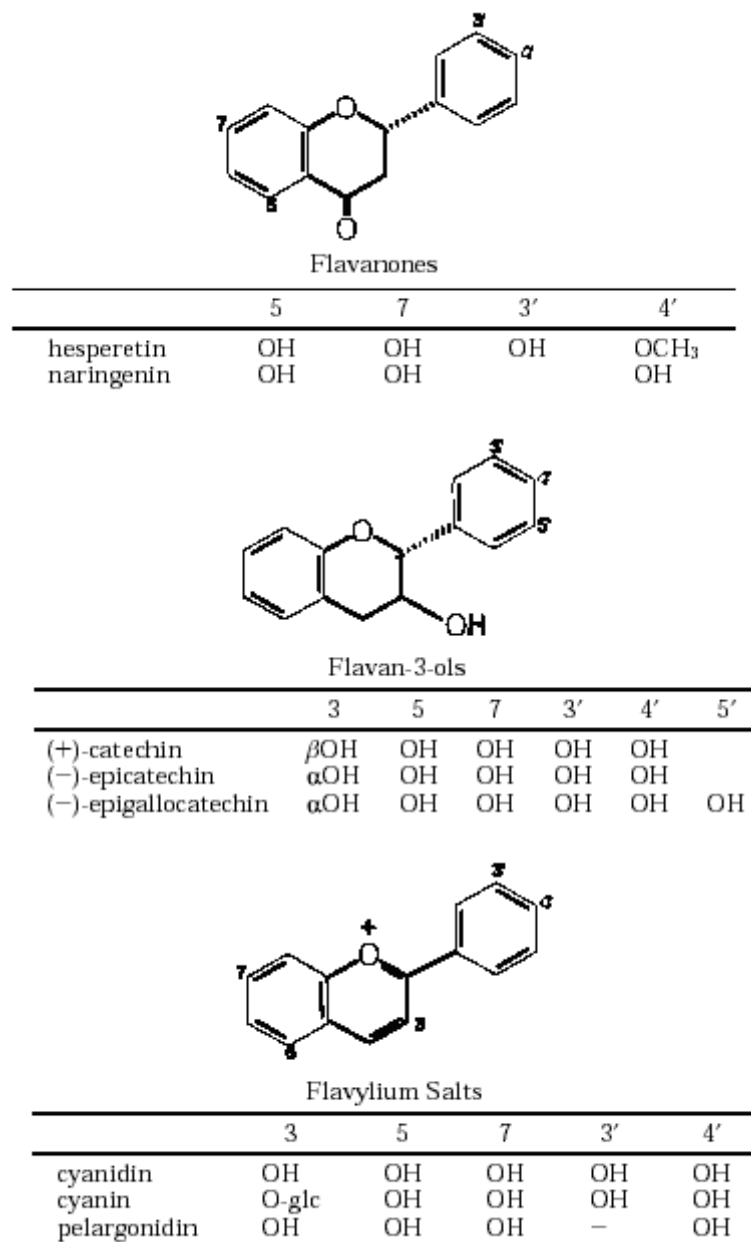


Fig. 3: In **A**, scheletro di base dei flavonoidi; in **B**, struttura delle principali classi di flavonoidi (Pietta, 2000).

Altri composti fenolici, sintetizzati lungo ramificazioni laterali della *pathway* biosintetica delle antocianine, sono cialconi, auroni, stilbeni e proantocianidine, anche note come tannini condensati, probabilmente derivati dalla polimerizzazione di unità flavan-3-oliche (catechine, epicatechine) (Schwab and Raab, 2004). La via biosintetica di questi composti è quella dei fenilpropanoidi (Fig. 4), studiata in varie specie e piuttosto conservata anche in fragola. Recentemente sono state caratterizzate nei nostri laboratori le sequenze dei geni strutturali specifici per sette enzimi chiave della *pathway* dei flavonoidi in fragola (Fig. 4; Almeida et al., 2007).

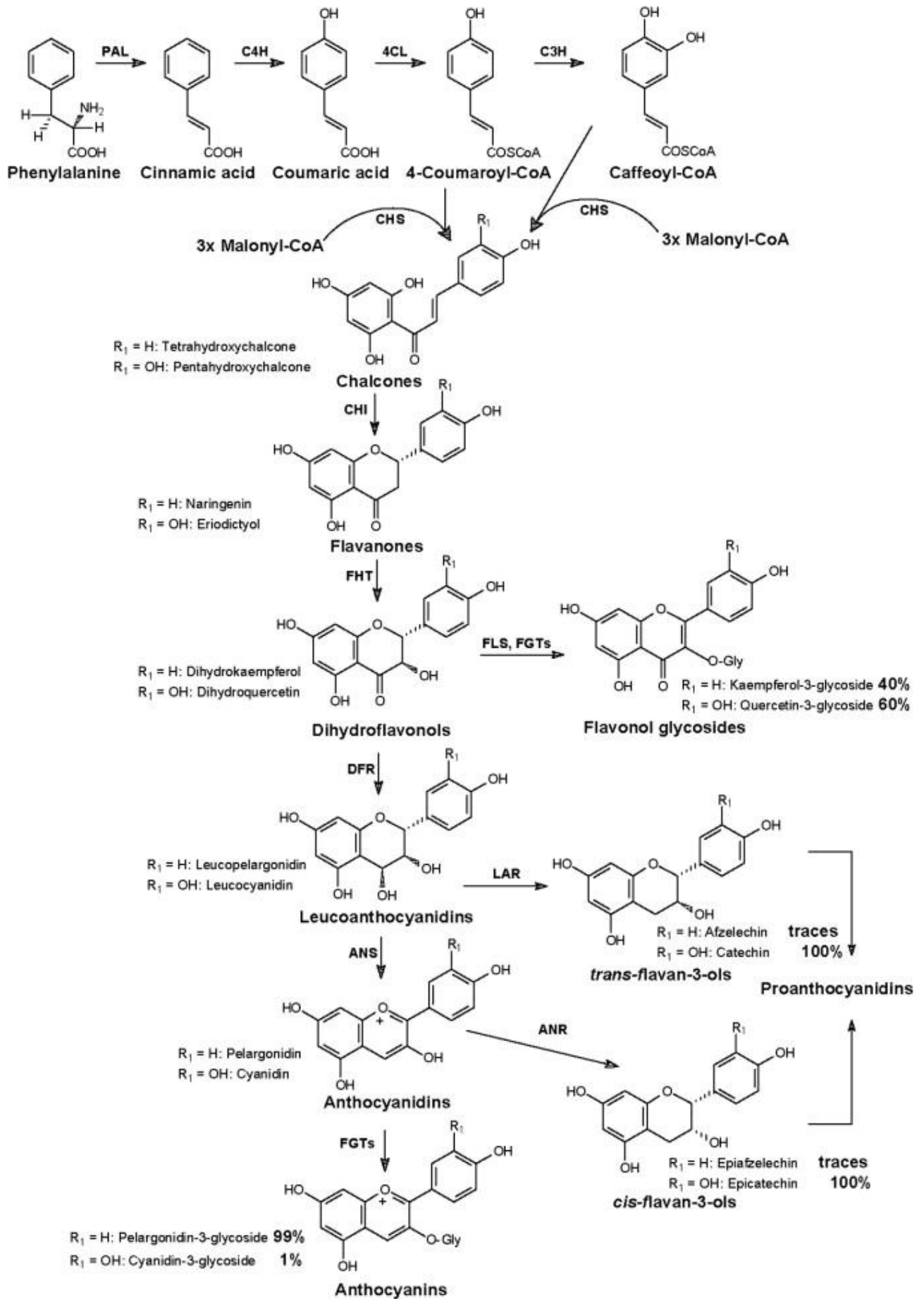


Fig. 4: *Pathway* e struttura delle principali classi di fenilpropanoidi presenti in fragola. Abbreviazioni: 4CL, p-cumarato-coA ligasi; ANR, antocianidina reductasi; ANS, antocianidina sintasi; C3H, p-cumaroli-coA 3-idrossilasi; C4H, acido cinnamico 4-idrossilasi; CHI, cialcone isomerasi; CHS, cialcone sintasi; DFR, diidroflavonol-4-reductasi; FGTs, flavonoide glicosiltransferasi; FHT, flavanone-3- β -idrossilasi; FLS, flavonol sintasi; LAR, leucoantocianidina reductasi; PAL, fenilalanina ammonio-liasi.

Le antocianine sono i flavonoidi più abbondanti nel frutto maturo e tra esse la più rappresentata è la pelargonidina-3-glucoside, seguita dalla cianidina-3-glucoside e dalla pelargonidina-3-rutinoside (Fig. 5; Schwab and Raab, 2004). Altri fenoli identificati all'interno del frutto sono i flavonoli quercetina e kamferolo (Fig. 5), che funzionano da copigmenti nella colorazione del frutto; sono presenti, inoltre, tannini, proantocianidine ed esteri degli acidi idrossibenzoico e idrossicinnamico. La fragola ha, infine, un contenuto relativamente elevato di acido ellagico, noto per le sue preziose proprietà anticarcinogeniche (Fig. 5; Schwab and Raab, 2004).

Il contenuto in flavonoidi della fragola è influenzato da fattori genetici e ambientali, nonché dallo stadio di sviluppo del frutto. Differenze significative nei pattern di accumulo di antocianine e proantocianidine all'interno del frutto rosso maturo sono state osservate sia tra varietà di fragola differenti, cresciute nelle stesse condizioni ambientali, che tra varietà identiche, coltivate in diverse aree geografiche (D'Amico and Perrotta, 2005). L'influenza della luce sull'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi delle antocianine nel frutto di fragola è fortemente suggerita dalla presenza di domini di legame per specifici fattori di trascrizione luce-sensibili, identificati a livello dei promotori a monte di alcuni di questi geni, caratterizzati recentemente nei nostri laboratori (dati non pubblicati).

Relativamente pochi sono in letteratura gli studi che riguardano le variazioni della composizione in flavonoidi del frutto di fragola durante la maturazione. Halbwirth *et al.* (2006), in particolare, hanno misurato l'attività specifica di sette enzimi strutturali della *pathway* dei flavonoidi in sei stadi successivi di maturazione (cv. Elsanta). La maggior parte degli enzimi testati mostrava un pattern simile, caratterizzato da due picchi di attività specifica. Il primo picco, raggiunto nei frutti verdi di taglia media, è correlato all'elevato contenuto di catechine, epicatechine e proantocianidine caratteristico dei frutti giovani. Concentrazioni elevate di flavan-3-

oli nei frutti verdi, d'altronde, contribuiscono all'astringenza contro i patogeni e gli erbivori. Nel corso della maturazione, le concentrazioni di flavan-3-oli si riducono progressivamente, mentre aumentano, invece, quelle di flavonoli ed antocianine.

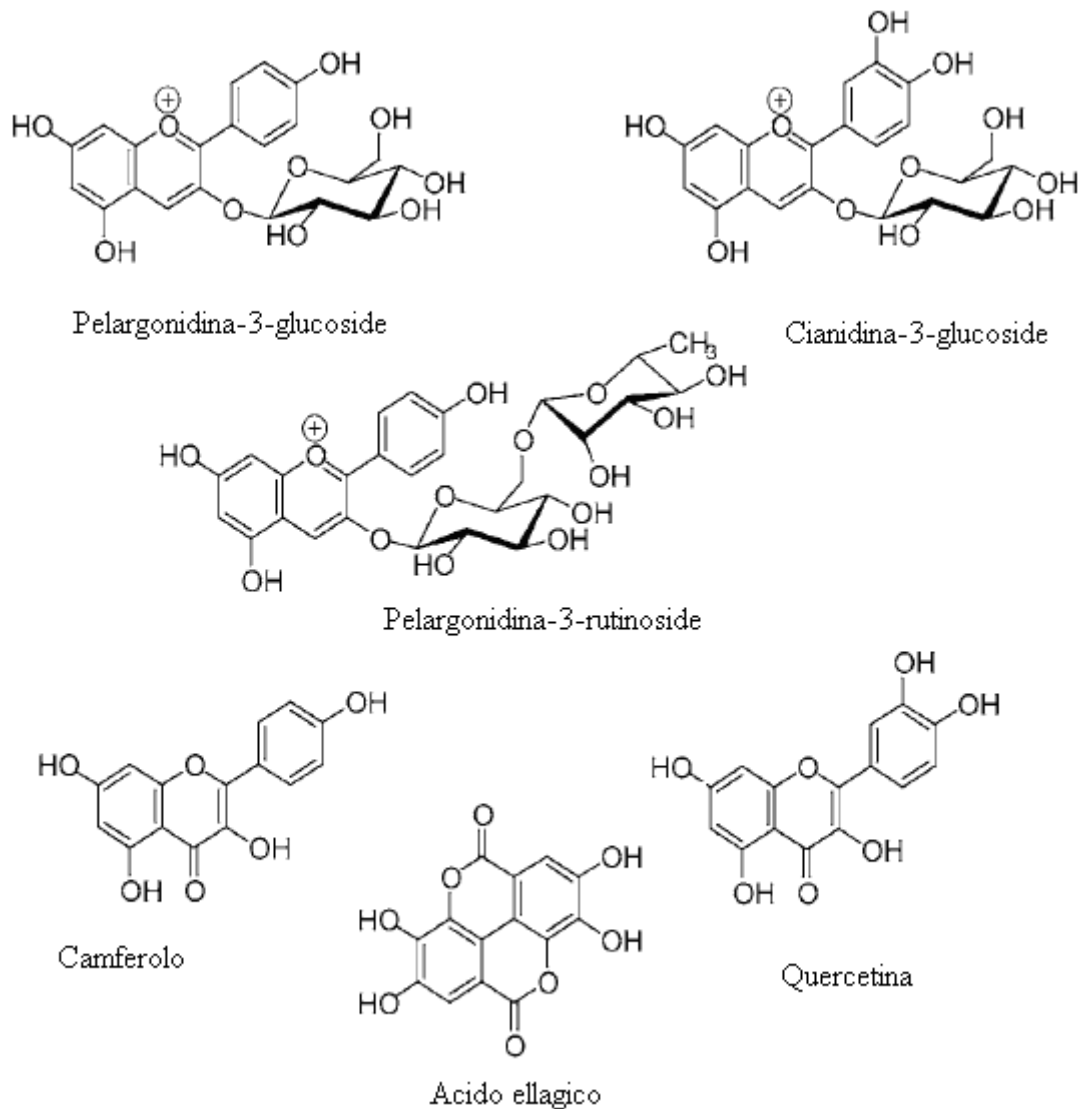


Fig. 5: Antocianine, flavonoli e fenoli identificati nel frutto di fragola (Schwab and Raab, 2004).

I flavonoli raggiungono il valore massimo di concentrazione nello stadio “*turning*”, in cui si riscontra anche un picco di attività dell’enzima FLS (flavonol sintasi), che catalizza la sintesi dei flavonoli a partire dai precursori diidroflavonoli (Fig. 4). La concentrazione massima di antocianine nel frutto si rileva, invece, nello stadio rosso maturo, al quale corrisponde il secondo picco di attività specifica della maggior parte degli enzimi strutturali considerati in questo studio. Nello stadio

matturo, il colore rosso brillante del frutto è determinato, appunto, dall'accumulo di antocianine, al fine di attrarre le specie erbivore che permettono la dispersione dei semi. Il fatto che il picco di concentrazione dei flavonoli preceda di poco quello delle antocianine nel corso della maturazione è stato interpretato alla luce del ruolo svolto dai flavonoli, composti incolori, in qualità di copigmenti che stabilizzano la struttura delle antocianine.

L'up-regolazione dei geni per la sintesi dei flavonoidi nelle fasi iniziale e finale dello sviluppo del frutto sono state documentate precedentemente anche in altre due specie, mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) e vite (*Vitis vinifera*) (Jaakola et al., 2002; Boss et al., 1996). Risultati piuttosto simili, inoltre, a quelli descritti da Halbwirth *et al.* (2006) sono stati ottenuti nei nostri laboratori, nei quali sono stati analizzati i profili di espressione, ottenuti mediante esperimenti di qRT-PCR, di vari geni strutturali della *pathway* dei flavonoidi nel frutto di fragola (cv Queen Elisa) in fase di maturazione (Almeida et al., 2007). I profili trascrizionali ottenuti concordano con le variazioni di concentrazione dei flavonoidi nel frutto durante la maturazione, riportate nella letteratura sopra citata: in particolare, il gene FLS mostra un unico picco di trascrizione nello stadio *turning* ed altri geni, come CHI, ANS, LAR, ANR (Fig. 4), presentano pattern con due picchi di trascrizione, il primo nei frutti verdi giovani (caratterizzati da un elevato contenuto di flavan-3-oli) ed il secondo nello stadio *turning* o in quello rosso maturo (nei quali si accumulano flavonoli ed antocianine) (Almeida et al., 2007).

1.3 I criptocromi

L'espressione di una classe di fotorecettori non fotosintetici, i criptocromi (CRY), può influenzare l'accumulo di antiossidanti nei frutti (Giliberto et al., 2005; Jaakola et al., 2004). In pomodoro, per esempio, l'overespressione della proteina CRY2 produce un sensibile incremento nel contenuto di licopene ed antocianine a livello della bacca (Giliberto et al., 2005). Nel contesto degli studi sui fattori

molecolari correlati all'accumulo di metaboliti antiossidanti nei frutti di olivo e fragola, i geni per i CRY sono stati parzialmente caratterizzati in entrambe le specie.

I CRY sono flavoproteine fotorecettori della luce blu (400-500 nm) e/o degli UV-A (320-400 nm), che mediano la fotoregolazione della crescita e dello sviluppo delle piante (Lin and Shalitin, 2003).

A partire dall'identificazione del primo gene per un criptocromo (*cry*) in *Arabidopsis* nel 1993 (Ahmad and Cashmore, 1993), altri geni *cry* sono stati individuati in tutto il regno delle piante (dicotiledoni, monocotiledoni, felci, muschi, alghe), nonché in batteri ed animali (compreso l'uomo) (Lin, 2002; Lin and Shalitin, 2003).

La maggior parte delle specie di piante studiate contiene più geni *cry*: in *Arabidopsis*, per esempio, ce ne sono almeno tre (*cry1*, *cry2* e *cry3*) (Ahmad and Cashmore, 1993; Hoffman et al., 1996; Lin et al., 1996; Kleine et al., 2003), come anche nelle monocotiledoni orzo e riso (*cry1a*, *cry1b* e *cry2*) (Perrotta et al., 2001; Matsumoto et al., 2003); mentre nelle felci (*Adiantum capillus-veneris*) e nei muschi (*Physcomitrella patens*) ne sono stati individuati rispettivamente cinque e due (Kanegae and Wada, 1998; Imaizumi et al., 2000, 2001). In pomodoro (*Solanum lycopersicon*), oltre ai tre geni *cry1a*, *cry1b* e *cry2* ortologhi a quelli di *Arabidopsis*, orzo e riso (Perrotta et al., 2000, 2001), recentemente è stato identificato un quarto gene *cry*, omologo a *cry3* di *Arabidopsis* (Facella et al., 2006).

Le conoscenze attuali riguardo alla struttura dei criptocromi derivano da analisi di sequenza, mutanti e proteine ricombinanti, *in vitro* o in piante transgeniche. La maggior parte dei criptocromi di piante (70-80 kDa) presenta due domini (Fig. 6): un dominio N-terminale, caratterizzato da un'elevata omologia con le DNA fotoliasi e, pertanto, chiamato anche PHR (*PHotolyase Related*), ed un dominio C-terminale, che non mostra rilevante similarità con proteine finora note (Lin and Shalitin, 2003).

Le DNA fotoliasi sono flavoproteine di 55-65 kDa, presenti in procarioti ed eucarioti, che assorbono nella regione blu/UV-A e catalizzano la riparazione dei danni al DNA causati dall'esposizione alla luce UV ad alta energia (280-320 nm).

Queste proteine sono ritenute i progenitori evolutivi dei criptocromi (Lin and Shalitin, 2003). Le fotoliasi contengono due cromofori, una pterina (5,10-meteniltetraidrofolato, o MTHF) o una deazaflavina (8-idrossi-7,8-deazariboflavina, o 8-HDF), che fungono da antenna di raccolta della luce, ed una flavinadenindinucleotide (FAD), essenziale per l'attività catalitica di tali enzimi (Lin, 2002). Tutti i residui importanti per il legame dei cromofori nelle fotoliasi sono altamente conservati nei criptocromi che non possiedono, tuttavia, l'attività di riparazione fotoliasi-like. L'analisi di criptocromi ricombinanti, derivati da *Arabidopsis* e purificati da sistemi di espressione eterologa, ha dimostrato che tali proteine sono capaci di legare sia il FAD che l'MTHF e che il dominio PHR dei criptocromi contiene i siti di legame per i due cromofori (Fig. 6) (Lin, 2002).

Sebbene di lunghezza variabile, la struttura primaria della regione C-terminale delle proteine CRY è caratterizzata dalla presenza di almeno tre motivi costanti (Fig. 6):

- DQXVP, all'inizio della regione C-terminale,
- una regione contenente un numero variabile di residui E o D,
- STAES seguito dalla sequenza GGXVP, all'estremità C-terminale della proteina.

Poichè la successione lineare di tali motivi risulta ben conservata, la regione che li contiene è chiamata DAS (che sta per DQXVP-acidic-STAES) (Lin, 2002; Lin and Shalitin, 2003) (Fig. 6).

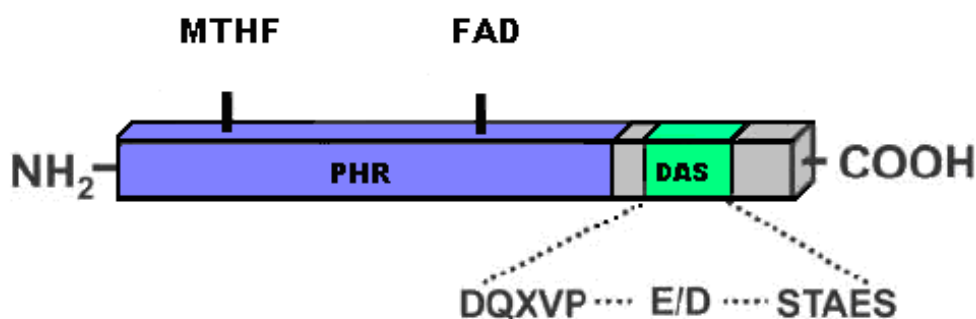


Fig. 6: Struttura dei criptocromi. In azzurro, è rappresentato il dominio PHR, altamente conservato; in grigio, la regione C-terminale, di estensione variabile e contenente il dominio DAS, colorato in verde. Tra le linee tratteggiate sono riportati i motivi altamente conservati e caratteristici del dominio DAS.

La proteina CRY1B di pomodoro ha il dominio C-terminale incompleto, ossia troncato prima del motivo STAES (Perrotta et al., 2001). Questa proteina, lunga 583 aminoacidi, è la più corta tra i CRY di pomodoro e l'elevato grado di omologia di sequenza riscontrato nel confronto con CRY1A ha indotto a supporre che il gene *cry1b* si sia originato per duplicazione di *cry1a* in pomodoro. Un evento simile ed indipendente avrebbe generato il gene omologo *cry1b* in orzo (Perrotta et al., 2001).

Differenze di tipo strutturale conferiscono alle proteine CRY3 di piante l'appartenenza ad una classe distinta di CRY, anche definiti CRY DASH (che sta per *Drosophila Arabidopsis Synechocystis Homo sapiens*). La prima proteina CRY3 di pianta è stata identificata solo nel 2003 in *Arabidopsis* (Kleine et al., 2003). In *Arabidopsis*, il gene *cry3* (o *cry* DASH) è costituito da 2825 pb e codifica per una proteina lunga 526 aminoacidi. Quest'ultima presenta un dominio PHR, in cui sono compresi i siti di legame ai cromofori (pterina e FAD) ed un peptide segnale N-terminale di 40 aminoacidi (Fig. 7). E' stato dimostrato che il peptide segnale indirizza la proteina nei mitocondri e nei cloroplasti in maniera specifica. Questa proteina, inoltre, manca del dominio DAS C-terminale, è in grado di legare in maniera specifica il FAD, ma non presenta attività fotoliasica (Kleine et al., 2003; Fig. 7).

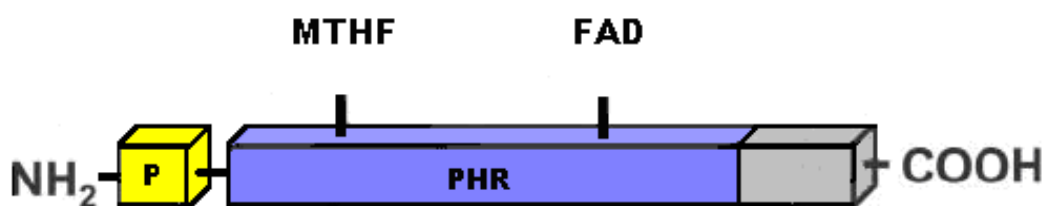


Fig. 7: Struttura di CRY3 di *Arabidopsis*. In azzurro è rappresentato il dominio PHR; in grigio la regione C-terminale, che manca del dominio DAS; in giallo il peptide segnale (P).

Le funzioni dei CRY delle piante superiori sono state studiate principalmente mediante la caratterizzazione fenotipica di mutanti di *Arabidopsis* e pomodoro (*Solanum lycopersicon*). In queste specie, i CRY risultano coinvolti nel controllo

della fotomorfogenesi, del tempo di fioritura, del ritmo circadiano, dell'espressione di geni modulati dalla luce.

Molte risposte fotomorfogenetiche mediate dai CRY sono associate al fenomeno della de-eziolatura (Lin and Shalitin, 2003). Una piantina eziolata si sviluppa da un seme germinato al buio, ha un ipocotile allungato e cotiledoni chiusi e privi di cloroplasti. L'esposizione alla luce causa inibizione dell'allungamento dell'ipocotile, apertura dei cotiledoni, accumulo di antocianine, sviluppo dei cloroplasti ed inizio dell'attività fotosintetica.

Esperimenti di overespressione di CRY1 e CRY2 in piante transgeniche di *Arabidopsis* hanno permesso di analizzare il ruolo di entrambi i fotorecettori nelle risposte di de-eziolatura (Lin et al., 1998). L'inibizione dell'allungamento degli ipocotili e l'espansione delle cotiledoni in presenza di luce blu ad alte intensità risultano mediate prevalentemente da CRY1, mentre a basse intensità di luce blu anche CRY2 risulta coinvolto. Questi risultati concordano con la scoperta che l'espressione di CRY2, ma non di CRY1, è regolata negativamente dall'intensità della luce blu. Comunque, nel mediare le risposte di de-eziolatura i CRY intervengono assieme ad altri fotorecettori, come i fitocromi (PHY) A e B e le fototropine (PHOT1) (Lin et al., 1998).

I CRY agiscono insieme con i PHY anche nel controllo della fioritura e del ritmo circadiano (Lin and Shalitin, 2003). In *Arabidopsis*, il fotorecettore CRY2 gioca un ruolo importante nell'induzione della fioritura, fortemente influenzato dalla lunghezza del giorno (o fotoperiodo) e dalla qualità della luce (Guo et al., 1998).

I CRY, infine, sono in grado di influenzare l'orologio circadiano, un sistema molecolare che permette alle piante di regolare le proprie funzioni fisiologiche in base alla durata dei cicli luce-buio, mediante l'espressione differenziale di specifici geni *target* modulati dalla luce (Lin and Shalitin, 2003). Il movimento delle foglie, i processi di crescita, l'apertura dei fiori e l'emissione della fragranza, il ciclo regolare di ioni e metaboliti dentro e fuori gli organuli, la fotosintesi ed il metabolismo del

carbonio sono tutte attività controllate dall'orologio circadiano e che si avvalgono, in alcuni casi, dell'azione esplicata da fotorecettori specializzati come i CRY.

1.4.1 Sequenziamento 454

Questa tecnologia è stata adoperata allo scopo, innanzitutto, di caratterizzare sequenze geniche espresse nel frutto di olivo, una specie oleogena di grande importanza economica nei paesi del Mediterraneo, eppure ancora molto poco conosciuta dal punto di vista genetico-molecolare. Per alcune specie, come *Arabidopsis*, riso, pomodoro e mais, la disponibilità di sequenze genomiche complete o di ampi set di ESTs (*Expressed Sequence Tags*) ha permesso l'analisi su larga scala dei pattern di espressione genica in cellule, tessuti e organi. Negli ultimi decenni, la produzione di un'enorme quantità di dati di genomica e trascrittomica è stata favorita dall'evoluzione in parallelo di tecnologie e strumentazioni sempre più sofisticate e sensibili. Tra queste, il *pyrosequencing* 454 è una tecnologia di recente sviluppo per il sequenziamento del DNA su larga scala (Margulies et al., 2005).

Il metodo del *pyrosequencing* è basato sulla *detection* di segnali di bioluminescenza prodotti dal rilascio di molecole di pirofosfato (PPi) durante la sintesi del DNA (Ronaghi, 2006). Una cascata di reazioni enzimatiche genera, infatti, luce visibile in misura proporzionale al numero di nucleotidi incorporati durante la sintesi di una molecola di DNA complementare al template da sequenziare. In particolare (Ronaghi, 2006):

1. una DNA *polymerase* (di solito viene utilizzato il frammento di Klenow di *Escherichia coli*, DNA Pol I) catalizza l'incorporazione dei nucleotidi, causando il rilascio di una molecola di PPi per ogni nucleotide incorporato.
2. Il PPi rilasciato viene convertito in ATP da una *ATP sulfurilase* (un'enzima ricombinante ottenuto dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*).

3. L'ATP prodotto viene utilizzato dall'enzima *luciferase* (estratto dalla lucciola *Photinus pyralis*) nella reazione di ossidazione della luciferina, che genera luce visibile.
4. Un'enzima *apyrase* (estratto da patata) degrada progressivamente i nucleotidi non incorporati nei derivati di- e monofosfati corrispondenti (Ronaghi et al., 2006).

La tecnologia 454 si basa su una strategia di *pyrosequencing*, che sfrutta uno strumento dotato di piastre a fibre ottiche, contenenti circa 1.6×10^6 pozzetti, di diametro pari a 44 μm e di capacità pari a 75 pl (Margulies et al, 2005). Il templatato da sequenziare viene frammentato legato a specifici adattatori ed ancorato a biglie, in condizioni tali che a ciascuna biglia si leghi una ed una sola molecola di acido nucleico a singolo filamento (Fig. 8, immagini 1-2-3). Le biglie vengono incorporate nelle gocce di un'emulsione contenente i reagenti necessari per l'amplificazione, mediante PCR, di ciascuna molecola di acido nucleico: di conseguenza, la superficie di ciascuna biglia porterà ancorate molteplici copie identiche della molecola ad essa originariamente ancorata (Fig. 8, immagine 4). Ciascuna biglia viene depositata all'interno di un pozzetto, assieme a biglie di dimensioni inferiori, che portano immobilizzati sulla loro superficie gli enzimi necessari per il *pyrosequencing* (Fig. 8, immagine 5; Margulies et al, 2005).

I vantaggi più eclatanti di questa tecnologia, rispetto al metodo classico di Sanger basato sull'elettroforesi capillare, sono sicuramente da attribuire alla quantità massiva di dati prodotti con costi e tempi ridotti: in un'unica corsa della durata di circa 10 ore e mediante l'impiego di volumi di reagenti dell'ordine di picolitri (pl) è possibile sequenziare in totale circa 400 milioni di basi, con una lunghezza media di lettura fino a 400 basi (Margulies et al, 2005).

Il *pyrosequencing* 454 può essere utilizzato per molteplici applicazioni ed in vari settori della ricerca sperimentale. Nel settore della ricerca genomica, ad esempio, viene impiegato per la scoperta *de novo* di sequenze geniche, per analisi di variabilità genetica e di *transcript profiling* (Agaton et al., 2002; Ahmadian et al., 2006).

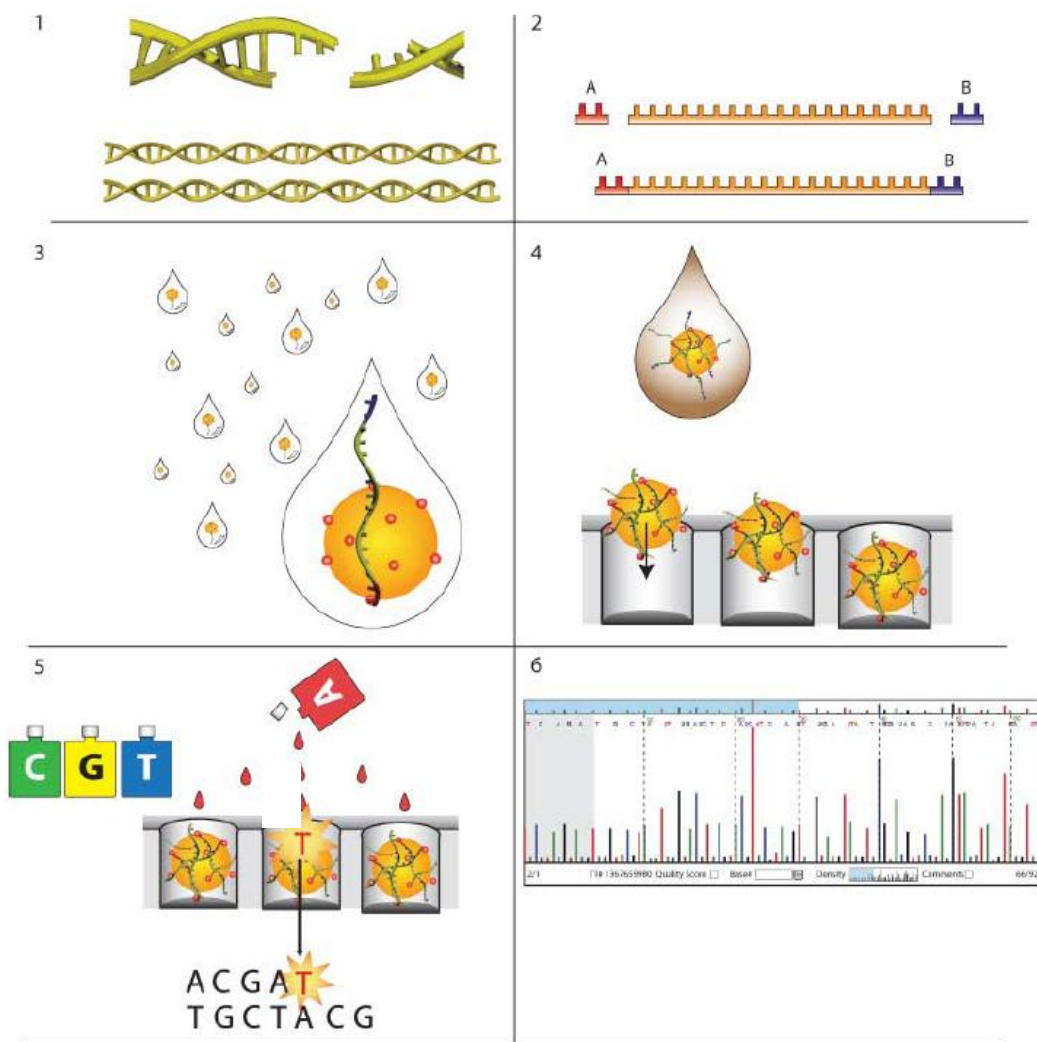


Fig. 8: *Pyrosequencing 454*. Nelle immagini da 1 a 5 sono illustrate le fasi sequenziali di questa tecnologia (maggiori dettagli nel testo).

2. Scopo della tesi

Sebbene l'olivo figure tra le specie più antiche e di maggiore rilevanza economica nei paesi del Mediterraneo, le conoscenze relative alla struttura, organizzazione e contenuto genico del suo genoma diploide risultano ancora piuttosto scarse. Il numero esiguo di sequenze geniche ad oggi caratterizzate in olivo limita fortemente l'analisi delle basi genetico-molecolari dei tratti qualitativi di principale interesse per l'agricoltura, come la resistenza a stress biotici ed abiotici, la maturazione, le caratteristiche organolettiche dei frutti, nonché per la salute umana, associati alla composizione in acidi grassi e fenoli antiossidanti delle olive e dell'olio. Nel corso del dottorato, la tecnologia di *pyrosequencing* 454 è stata sfruttata al fine di incrementare il numero relativamente scarso di sequenze geniche finora caratterizzate in olivo, di esplorare il trascrittoma del frutto, identificare sequenze geniche differenzialmente espresse durante la maturazione e, infine, confrontare i pattern trascrittomici dei frutti in due stadi di sviluppo ed appartenenti a due genotipi di olivo con caratteristiche qualitative differenti. Tali genotipi sono stati scelti per differenze piuttosto rilevanti riscontrate, principalmente, nel contenuto in metaboliti secondari antiossidanti all'interno del frutto. Il database di EST da frutto, allestito con il sequenziamento 454, rappresenta una piattaforma unica ed indispensabile per futuri approcci sperimentali di studio dei caratteri qualitativi di maggior interesse nei frutti e nell'olio d'oliva.

Recenti dati di letteratura prodotti in varie specie hanno suggerito per i geni *cry* il ruolo di "candidati" nella regolazione dell'espressione del contenuto in metaboliti antiossidanti nei frutti di olivo e fragola. In entrambe le specie, particolarmente ricche di polifenoli antiossidanti all'interno del frutto (principalmente secoiridoidi glicosidi in olivo e flavonoidi in fragola), i geni *cry* sono stati identificati e parzialmente caratterizzati mediante esperimenti di clonaggio e sequenziamento di prodotti di PCR gene-specifici, ottenuti mediante strategie di genomica classica (PCR 5'inversa, PCR 3'RACE). In parallelo e mediante approcci di qRT-PCR, sono state condotte analisi

di *transcript profiling* dei geni *cry*, comparative tra stadi di maturazione e tra varietà caratterizzate da concentrazioni fenoliche differenziali nei frutti di in olivo e fragola. Questi studi di espressione comparativa rappresentano saggi preliminari sul potenziale ruolo di questi geni “candidati” nell’accumulo differenziale di polifenoli antiossidanti nel frutto delle varietà studiate.

3. Materiali e Metodi

3.1 Estrazione del DNA genomico totale da foglie tenere di olivo e fragola

Il DNA cellulare totale di fragola (cv. *Queen*) è stato estratto da tessuto fresco secondo il protocollo descritto da Della Porta et al. (1983):

- 1 gr di tessuto fresco, posto in 10 ml di **Buffer di estrazione** e 70 μ l di 2 β -mercaptoetanololo, viene omogeneizzato con frullatore Ultra-Turrax e addizionato con 1 ml di SDS 10%;

Buffer di estrazione (100 ml):

NaCl 5 M	10 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	10 ml
Tris-HCl 1M pH 8.0	10 ml
H ₂ O bidistillata sterile	a volume

- dopo incubazione a 65°C per 15 min si aggiungono 3 ml di Acetato di Potassio 5M e si trasferisce in ghiaccio per 30 min;
- si addizionano 3 ml di cloroformio e si centrifuga a 4°C e a 15000 rpm per 5 min;
- 12 ml del supernatante vengono addizionati con 10 ml di isopropanolo freddo ed incubati a -20°C per 30 min;
- si centrifuga a 4°C e a 15000 rpm per 10 min, ed il pellet, risospeso in 600 μ l di TE, viene addizionato con 6 μ l di RNasi (10 mg/ml);
- la soluzione viene incubata a 37°C per 30 min, addizionata a 200 μ l di fenolo-cloroformio e centrifugata a 4°C e a 15000 rpm per 5 min;

- si recupera il supernatante, si aggiungono 25 μl di NaCl 5M e 400 μl di Isopropanolo freddo e si lascia in ghiaccio per 10 min;
- si centrifuga a 4°C e a 15000 rpm per 5 min e si precipita aggiungendo EtOH all'80% e centrifugando a 4°C e a 15000 rpm per 3 min;
- il DNA precipitato viene, infine, risospeso in 100 μl di TE;
- dopo la determinazione spettrofotometrica (spettrofotometro UV300, Thermospectronic) della concentrazione del DNA estratto ($\lambda = 260 \text{ nm}$), 1 μl di quest'ultimo viene caricato su gel d'agarosio al 2%, in presenza di Bromuro di Etidio (0,5 mg/ml) e, dopo corsa elettroforetica, il gel viene visualizzato ai raggi UV.

3.2 Amplificazione genica *in vitro* mediante PCR

Tutte le reazioni di amplificazione sono state effettuate in termociclatori "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystem), con cicli di numero e durata variabile e secondo il seguente protocollo:

Buffer 10 X (Biotool)	2 μl
MgCl ₂ (50 mM, Biotool)	1 μl
dNTP mix (0.5 mM, Amersham)	2 μl
primer <i>forward</i> (10 μM)	1 μl
primer <i>reverse</i> (10 μM)	1 μl
Taq DNA polimerasi (5U/ μl , Biotool)	0.1 μl
stampo	x μl (100 ng)
H ₂ O bidistillata sterile	fino a 20 μl

Gli oligonucleotidi utilizzati come primer nelle varie reazioni di amplificazione sono stati progettati *in silico* con l'ausilio di *softwares* specifici e sintetizzati chimicamente su nostra ordinazione da ditte specializzate.

3.3 Purificazione dei prodotti di PCR da gel di agarosio

I prodotti dell'amplificazione *in vitro*, ottenuti dal DNA genomico di fragola, prima di essere sottoposti al clonaggio, sono stati caricati su un gel di agarosio (1,5-2%) e sottoposti ad elettroforesi nel tampone TAE 1x. Dopo la corsa elettroforetica (effettuata a 60 V/cm), che permette l'allontanamento dei nucleotidi non incorporati, la parte di gel contenente il DNA amplificato è stata tagliata, facendo uso di un bisturi sterile, posta in un tubo tipo Eppendorf da 1.5 ml e pesata. Il DNA, ancora intrappolato nel gel, è stato purificato mediante "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences).

3.4 Clonaggio *in vivo* dei prodotti di PCR

Per il clonaggio dei prodotti di PCR in cellule di *E. coli* è stato utilizzato il "TA Cloning Kit, Version V" (Invitrogen). Come vettore per il clonaggio, questo kit fornisce il plasmide pCR 2.1 (Fig. 9).

Il prodotto di PCR da clonare viene, innanzitutto, quantificato mediante lettura spettrofotometrica della sua densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 260 nm. Il parametro OD, moltiplicato per un fattore di correzione e per il fattore di diluizione, restituisce il valore di concentrazione del prodotto di amplificazione, espresso in ng/ μ l.

Gli esperimenti di clonaggio prevedono le seguenti fasi:

1. reazione di ligazione del prodotto di PCR nel plasmide vettore (secondo protocollo riportato nelle istruzioni del kit);
2. trasformazione, mediante shock termico, di cellule di *E. coli* competenti con il plasmide ricombinante;
3. screening, mediante PCR, ed isolamento delle colonie batteriche trasformate;
4. estrazione del DNA plasmidico (MiniPrep) dai cloni batterici ricombinanti.

3.4.1 Ligazione

La ligazione del prodotto di PCR nel plasmide pCR 2.1 (Fig. 9) è favorita dal fatto che la Taq polimerase, utilizzata nelle reazioni di PCR, aggiunge sempre un residuo di deossiadenosina (A) al -3' di ciascun prodotto di amplificazione, indipendentemente dal template; il vettore linearizzato pCR 2.1, d'altra parte, possiede al -3' un singolo residuo di deossitimidina (T). L'appaiamento tra i residui T=A aumenta, dunque, l'efficienza di inserimento del prodotto di PCR nel vettore di clonaggio (Fig. 10).

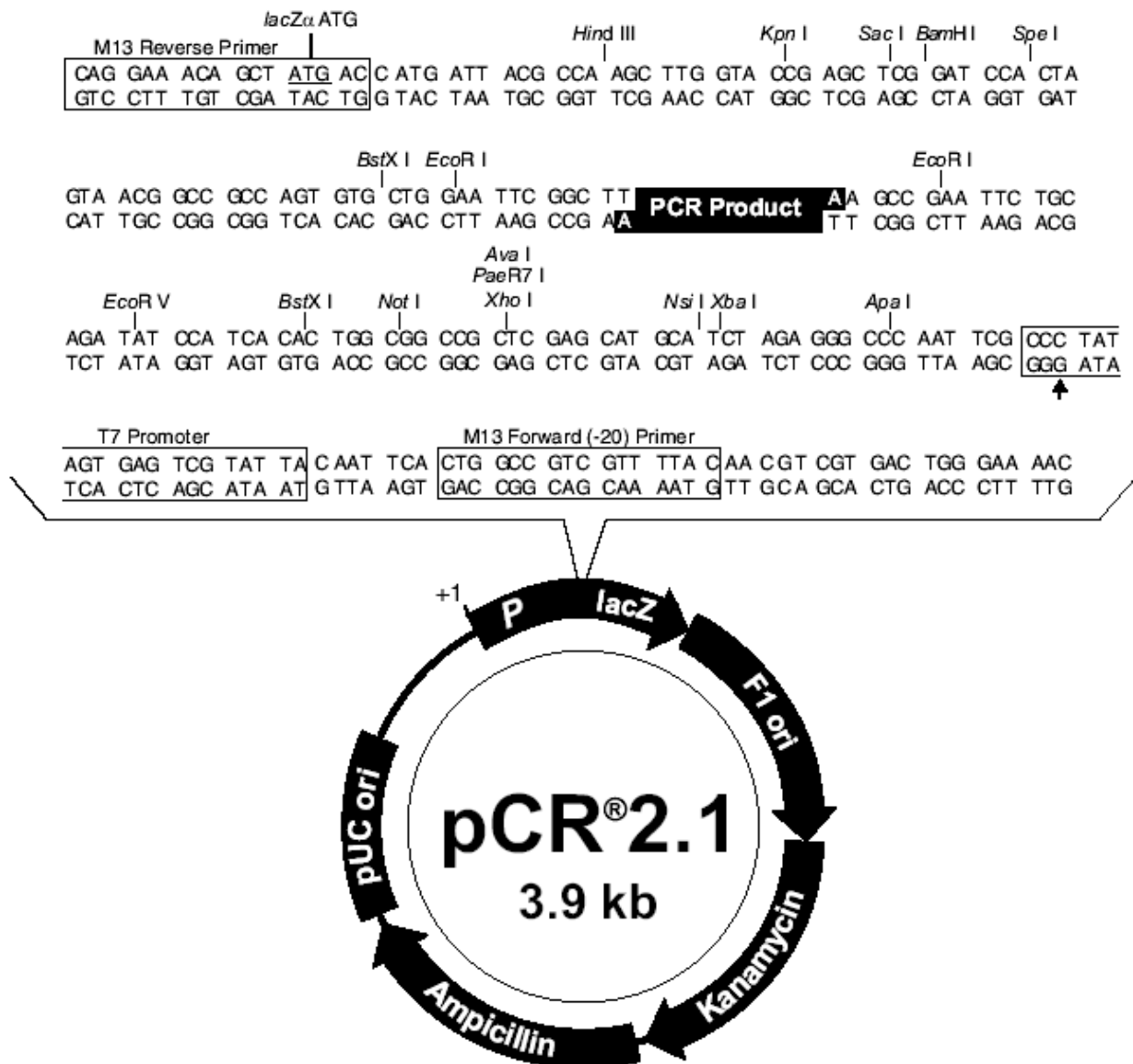


Fig. 9: Mappa e sito di clonaggio del vettore pCR 2.1 (<http://www.invitrogen.com>).

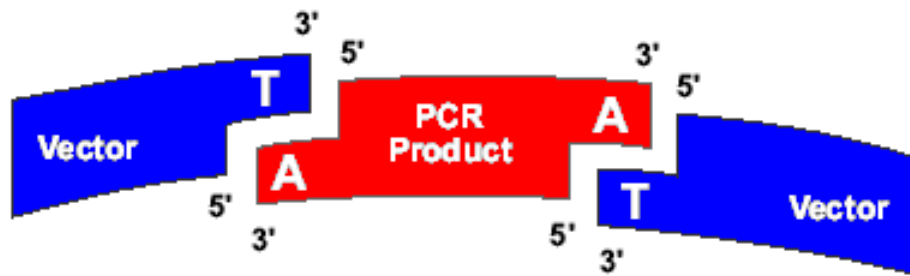


Fig. 10: Metodo del “TA Cloning” per la ligazione dell’inserto nel vettore di clonaggio.

3.4.2 Trasformazione

Per ottenere che incorporassero il vettore, cellule competenti (ceppo commerciale) del batterio *E. coli* sono state sottoposte a shock termico. Il protocollo utilizzato è il seguente:

- 5 µl di reazione di ciascuna reazione di ligazione vengono addizionati a 300 µl di cellule batteriche competenti in un tubo Eppendorf da 1.5 ml, lasciato poi in ghiaccio per 20-30 minuti;
- si effettua lo shock termico: il tubo Eppendorf viene trasferito su un thermoblock a 42°C per 1 min, poi in ghiaccio per 1 min ed ancora a 42°C per 1 min;
- si addizionano 500 µl di terreno di coltura LB e si lascia per 45 min a 37°C;

LB Agar:

Triptone	10 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
H ₂ O bidistillata sterile	fino ad 1L

- si centrifuga a 10000 rpm per 1 min per raccogliere le cellule sul fondo del tubo (*pellet*) e si elimina il supernatante fino ad un volume di circa 100 μ l;
- il *pellet* cellulare viene risospeso nel volume di supernatante rimasto e distribuito sulla superficie di una piastra di LB agar contenente ampicillina (50 μ g/ml) e sul quale sono stati precedentemente piastrati 40 μ l di X-Gal (40 mg/ml) ed 4 μ l di IPTG (1M);
- la piastra viene lasciata *overnight* a 37°C nell'incubatore.

3.4.3 Screening ed isolamento dei cloni ricombinanti

In seguito allo shock termico, le colonie batteriche cresciute su piastra a 37°C *overnight* acquistano, per incorporazione del plasmide vettore, la resistenza all'ampicillina contenuta nel terreno selettivo. Tuttavia, solo alcune tra queste incorporano il plasmide ricombinante, cioè con l'inserto al suo interno. I sistemi di clonaggio utilizzati permettono lo screening delle colonie d'interesse in base al loro colore: le colonie blu sono formate da cellule capaci di metabolizzare il galattosio (X-Gal) aggiunto al terreno, perchè hanno incorporato il plasmide che porta il gene *lacZ* funzionale (che codifica per l'enzima β -galattosidasi, necessario per la scissione del galattosio nei due monosaccaridi costituenti); le colonie bianche corrispondono, invece, a cellule incapaci di metabolizzare il galattosio perchè, sebbene abbiano incorporato il plasmide, il gene *lacZ* non è funzionale. Tra le colonie bianche devono essere selezionate quelle che hanno effettivamente incorporato il plasmide ricombinante, quelle cioè in cui il gene *lacZ* non è espresso perchè il suo promotore è interrotto dall'inserto. In entrambi i plasmidi utilizzati, infatti, il sito di clonaggio multiplo si trova all'interno della regione del promotore *lacZ*, appunto per favorire lo screening delle colonie successivo alla trasformazione (Fig. 9).

Per selezionare tra le colonie bianche quelle verosimilmente ricombinanti, 10-15 colonie bianche/piastra vengono prelevate con le punte sterili di una pipetta,

stemperate in 10 μl di H_2O bidistillata sterile. 3 μl di questa soluzione sono utilizzati come templatato in reazioni di PCR (allestite in un volume totale di 20 μl , secondo il protocollo precedentemente descritto) ed amplificati con due primer, M13 Forward ed M13 Reverse (Fig. 9), che hanno sequenze complementari alle regioni fiancheggianti il sito d'incorporazione dell'inserto nel vettore.

Il profilo di temperature impostato sul termociclatore prevede 25 cicli di amplificazione con:

- denaturazione a 94°C per 30 sec
- *annealing* a 52°C per 30 sec
- estensione a 72°C per 1 min

Dopo la corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%), i prodotti di PCR ottenuti vengono analizzati per le loro dimensioni, utilizzando come riferimento un marcatore di peso molecolare. I prodotti di PCR di dimensioni apparentemente simili a quelle dell'inserto permettono di selezionare tra le colonie bianche quelle che con maggiore probabilità hanno incorporato il plasmide contenente l'inserto d'interesse.

I 7 μl rimasti delle colonie stemperate in H_2O bidistillata sterile e selezionate come ricombinanti vengono trasferiti in circa 3 ml di terreno di coltura liquido LB, contenente ampicillina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e lasciati crescere *overnight* in incubatore, a 37°C e sotto agitazione.

3.4.4 Estrazione del DNA plasmidico (MiniPrep)

Dalle colture batteriche cresciute *overnight* viene estratto il DNA plasmidico, secondo il seguente protocollo:

- 1.5 ml circa di ciascuna coltura sono trasferiti in un tubo Eppendorf da 1.5 ml e centrifugati per 3 min a 10000 rpm;
- dopo aver rimosso il supernatante, il pellet cellulare viene risospeso in 100 μl di **Soluzione I**;

Soluzione I:

Tris	25mM	pH 8.0
EDTA	10mM	pH 8.0
H ₂ O bidistillata sterile	a volume	

- vengono aggiunti 100 µl di **Soluzione II** e, dopo averli agitati alcune volte per inversione, i tubi rimangono in ghiaccio per 5 min;

Soluzione II:

NaOH	0.2 N
SDS	1%
H ₂ O bidistillata sterile	a volume

- vengono aggiunti 150 µl di **Soluzione III** fredda (a 4°C) ed i tubi, agitati nuovamente alcune volte per inversione, vengono lasciati in ghiaccio per altri 5 min;

Soluzione III:

AcK	3M o 5M
SDS	1%

- i tubi vengono centrifugati per 5 min a 20000 rpm ed il supernatante recuperato e trasferito in un nuovo tubo Eppendorf da 1.5 ml;
- viene aggiunto 1 ml di etanolo freddo al 95% ed i tubi sono incubati a -20°C per 20-30 min;
- dopo aver centrifugato i tubi per 5 min a 10000 rpm e rimosso il supernatante, il pellet viene lavato con 250 µl di etanolo al 70%;
- dopo aver centrifugato i tubi per 5 min a 10000 rpm e rimosso il supernatante, il pellet viene asciugato all'aria e poi risospeso in 30 o 50 µl di **TER**;

TER (TE+RNasi):

TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1mM)

RNasi 0.2 mg/ml

- i tubi vengono trasferiti su thermoblock a 37°C per 30-45 min;
- il DNA plasmidico, digerito con RNasi, viene infine purificato su colonnine cromatografiche caricate con la resina “Sepharose CL6B”.

3.5 Sequenziamento del DNA plasmidico

I prodotti di PCR clonati nei vettori plasmidici sono stati sequenziati nei laboratori GENELAB del C.R. ENEA Casaccia.

3.6 PCR 5' inversa

Questa tecnica di PCR, descritta da Siebert et al. (1995), permette di sequenziare la regione al 5' - di un frammento di DNA di sequenza nota.

Cinque campioni di DNA genomico totale di fragola (cv. *Queen*) sono stati digeriti per uno solo dei seguenti enzimi di restrizione (ciascun campione per un enzima diverso): *EcoRV*, *Ecl136II*, *DraI*, *PvuII* ed *Ssp*. Questi enzimi generano frammenti di restrizione con estremità “*blunt*”, alle quali è stato successivamente ligato uno speciale adattatore (*Adap*) (Fig. 11A).

Due serie di reazioni di PCR sequenziali vengono allestite secondo la strategia illustrata in Fig. 11B: nella prima serie, vengono utilizzati come stampo i cinque campioni di frammenti di restrizione di DNA genomico di fragola ligati all'adattatore e come coppia di primer un oligonucleotide standard ed interno all'adattatore (*PDS1*, primer *forward*) ed un oligonucleotide scelto all'interno della sequenza nota (*p1*, primer *reverse*); nella seconda serie di reazioni (PCR *nested*), si utilizzano come stampo i prodotti della prima serie di PCR, che vengono riamplicati con un primer standard (*PDS2*, *forward*) più interno e parzialmente sovrapposto a *PDS1*, ed un

primer (p2, *reverse*) complementare alla sequenza nota e più interno rispetto a p1. I due primer *forward*, PDS1 e PDS2, hanno sequenza identica e non complementare ad un frammento dell'adattatore, per cui non possono appaiarsi se non dopo che i rispettivi primer *reverse* hanno permesso la sintesi del filamento complementare a quello utilizzato come stampo (che includerà la regione ad essi complementare).

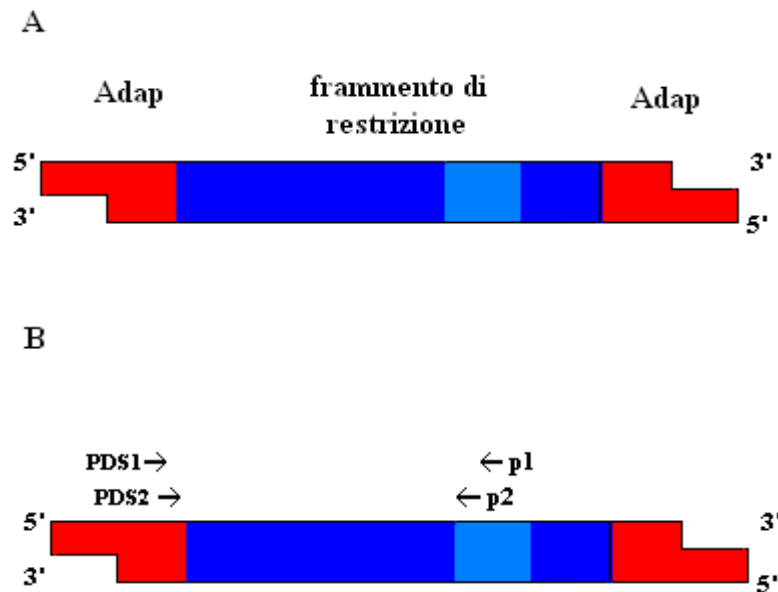


Fig. 11: In **A**, in blu è rappresentato un frammento di DNA genomico di fragola digerito per un enzima di restrizione che taglia con estremità “blunt”, comprendente una regione a sequenza nota, in azzurro; in rosso è rappresentato l'adattatore (*Adap*), ligato ad entrambe le estremità del frammento di restrizione. In **B**, è schematizzato il metodo Siebert (Siebert et al., 1995); p1 e p2 sono oligonucleotidi scelti all'interno della sequenza nota; PDS1 e PDS2 sono oligonucleotidi con sequenza identica ad un frammento dell'adattatore.

Il protocollo utilizzato in fragola, nelle due serie di reazioni di PCR, effettuate in un volume totale di 20 μ l, è il seguente:

Buffer 10 X	2	μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1	μ l
dNTP mix (0.5 mM)	2	μ l
PDS1 o PDS2 (10 μ M)	1	μ l
primer <i>reverse</i> (10 μ M)	1	μ l

Taq DNA polimerasi (5U/ μ l)	0.1	μ l
stampo	1	μ l
H ₂ O bidistillata sterile	11.9	μ l

I cicli impostati sul termociclatore prevedono:

- denaturazione a 94°C per 3 min
- *annealing* a 55°C per 45 sec
- estensione a 72°C per 3 min

I prodotti della PCR *nested*, analizzati mediante elettroforesi e purificati da gel di agarosio, sono stati successivamente clonati in cellule di *E. coli* e sequenziati.

3.7 PCR 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Questa tecnica permette di amplificare regioni di cDNA comprese tra una sequenza nota ed un oligonucleotide ancorato al 3'- del cDNA (Frohman et al., 1988).

Essa consiste in:

1. una reazione di retrotrascrizione dell'mRNA in cui, per la sintesi della prima *strand* del cDNA, viene utilizzato un primer standard (*oligodT Adap*) costituito da un oligonucleotide alla cui estremità 3'- è ancorata una serie di residui di deossitimidine (T);
2. una reazione di amplificazione effettuata con l'*oligodT Adap* ed un primer specifico disegnato all'interno della sequenza nota (p1), che permette, durante il primo ciclo di PCR, la sintesi della seconda *strand* del cDNA;
3. una seconda reazione di PCR (*nested*), in cui il prodotto della prima PCR viene amplificato con un primer specifico per la sequenza nota, ma più interno rispetto a p1 (p2), ed un primer (*Adap*), complementare ed interno alla sequenza dell'*oligodT Adap*.
4. I prodotti della PCR *nested* vengono, infine, clonati e sequenziati.

I protocolli sperimentali utilizzati sono i seguenti:

1. Sintesi della prima *strand* del cDNA:

- 1 μg di totRNA di fragola (cv. *Queen*) è stato diluito in 16.8 μl di H_2O bidistillata sterile ed incubato ad 80°C per 3 min;
- alla soluzione di RNA sono stati aggiunti 12.2 μl di mix e la soluzione è stata incubata a 42°C per 3 min;

MIX :

Buffer 5X (Invitrogen)	6	μl
DTT (0.1 M) (Invitrogen)	3	μl
dNTP mix (0.5 mM)	3	μl
<i>oligodT Adap</i> (50 μM)	0.2	μl

- è stato aggiunto 1 μl di enzima SuperScript II RT (Invitrogen) e la soluzione è stata incubata a 42°C per 60 min e poi a 80°C per 10 min.

2. Prima reazione di PCR (in un volume totale di 20 μl):

Buffer 10 X	2	μl
MgCl_2 (50 mM)	1	μl
dNTP mix (0.5 mM)	2	μl
<i>oligodT Adap</i> (10 μM)	1	μl
p1 (10 μM)	1	μl
Taq DNA polimerasi (5U/ μl)	0.1	μl
cDNA	2	μl
H_2O bidistillata sterile	10.9	μl

Il profilo impostato sul termociclatore prevedeva 5 cicli con:

- denaturazione a 94°C per 30 sec

- *annealing* a 50°C per 30 sec
- estensione a 72°C per 1 min

seguiti da 30 cicli con:

- denaturazione a 94°C per 30 sec
- *annealing* a 54°C per 30 sec
- estensione a 72°C per 1 min

3. PCR *nested*:

Buffer 10 X	2	μl
MgCl ₂ (50 mM)	1	μl
dNTP mix (0.5 mM)	2	μl
<i>Adap</i> (10 μM)	1	μl
p2 (10 μM)	1	μl
Taq DNA polimerasi (5U/μl)	0.1	μl
prodotto della prima PCR	1	μl
H ₂ O bidistillata sterile	11.9	μl

Il profilo impostato sul termociclature prevedeva 30 cicli con:

- denaturazione a 94°C per 30 sec
- *annealing* a 55°C per 30 sec
- estensione a 72°C per 45 sec

3.8 Esperimenti di qRT-PCR

La tecnica utilizzata si avvale di agenti intercalanti che, legandosi specificamente alla doppia elica del DNA, emettono fluorescenza, permettendo di mostrare l'incremento di molecole di acidi nucleici man mano che procede la reazione di amplificazione. Grazie all'uso di opportuni raggi laser, che in determinate fasi del processo eccitano l'agente intercalante SybrGreen ad una specifica lunghezza

d'onda, è possibile leggere la fluorescenza emessa, che risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di acido nucleico.

Il protocollo (Manuale utente, Real Time 7700-Abi Prism) usato per ogni gene da analizzare è il seguente:

cDNA	10ng
SybrGreen 2X	3µl
ROX	0.2µl
Primer forward (10 µM)	0.2µl
Primer reverse (10 µM)	0.2µl
H ₂ O bidistillata sterile	fino a 8ul

Gli esperimenti sono condotti con la “Real Time 7900 HT” (AbiPrism) in piastre da 384 pozzetti “MicroAmp Optical”(Applied Biosystems), ed ogni sequenza *target*, replicata tre volte, è amplificata da cDNA. In ogni piastra sono presenti due controlli negativi, NAC (“*no amplification control*”), privo di primer, ed NTC (“*no template control*”), privo di templatato.

Il profilo di PCR adoperato è il seguente:

- 50°C	2'
- 95°C	10'
1 ciclo	
- 95°C	15''
-58°C	1'
45 cicli	
- 95°C	5'
-60°C	1'
-60°-95°	30'
- 95°C	1'

Al termine di ogni analisi, il *software* “Abi Prism 7900 Sequence detection system” origina un *output*, in cui, ad ogni prodotto amplificato è stato associato uno specifico valore di Ct (che rappresenta il numero di cicli richiesti perché l’amplificazione possa assumere un andamento esponenziale; il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA presente nel campione in analisi).

Per l’analisi dei dati si utilizza il metodo della curva standard (Manuale utente, Real Time 7700-Abi Prism); in un primo momento, ogni frammento in esame è amplificato partendo da del cDNA retrotrascritto da RNA totale estratto dal controllo, quindi, il prodotto è quantificato allo spettrofotometro (Nanodrop ND1000) ed è successivamente diluito per sei volte (100 pg/ul, 10 pg/ul, 1 pg/ul, 100 fg/ul, 10 fg/ul, 1 fg/ul). Le sei diluizioni di ogni frammento, replicate due volte, sono amplificate con la qRT-PCR; grazie ai dati ottenuti è possibile disegnare, per ognuno di essi, una retta di taratura, riportando nelle ascisse il logaritmo dei fattori di diluizione e nelle ordinate il valore specifico di Ct. Per ogni retta è calcolata l’equazione:

$$y = - mx + q$$

dove:

$$y = Ct$$

$$x = \text{Log}_{10}[\text{DNA}]$$

m = Coefficiente angolare

q = Termine noto

Quindi, risolvendo l’equazione per l’incognita x, risulta:

$$x = \text{Log}_{10}[\text{DNA}] = (q-y)/m$$

da cui:

$$[\text{DNA}] = 10^{(q-y)/m}$$

I fg calcolati di ciascun frammento sono normalizzati rispetto ad un gene controllo (actina), espresso in maniera pressoché analoga nei campioni analizzati; infine, solo i dati normalizzati sono rapportati al controllo. I frammenti sono amplificati con primer specifici di circa 20 bp, disegnati grazie al programma

MacVector 1.5, per ottenere prodotti di PCR lunghi circa 100 bp, ad una temperatura di *annealing* di 58 °C.

3.9 Analisi bioinformatica dei dati di sequenza

Per analizzare i dati di sequenza ottenuti sono stati utilizzati specifici *softwares*, quali:

- **Vector NTI** (<http://www.invitrogen.com>), per l'*editing*, l'allineamento e l'assemblaggio delle sequenze in *contigs*;
- **Fasta3** (<http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>), per ricerche di similarità nelle principali banche dati di sequenze nucleotidiche (GenBank/EMBL) (Pearson and Lipman, 1988);
- **BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), per ricerche di similarità nelle principali banche dati di sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche (PDB/DBJ/PRF) (Altschul et al., 1997).

4. Risultati e Discussione

4.1 Campioni vegetali

4.1.1 Olivo

- Per l'identificazione e la caratterizzazione strutturale dei geni *cry* sono state utilizzati campioni di foglie tenere, fresche o congelate a -80°C , prelevate da piante di olivo della cv. Cassanese, presso il Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia (Arcavacata di Rende, CS).
- Per gli studi di espressione dei geni *cry* in olivo sono stati utilizzati:
 - a. campioni di frutti appartenenti a varietà coltivate presso il Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia (Arcavacata di Rende, CS), raccolti nel periodo tra settembre del 2005 e novembre del 2006, in tre stadi di maturazione (stadio verde, stadio invaiato, stadio nero). Presso il Centro di Ricerca suddetto, mediante cromatografia HPLC nelle drupe campionate e congelate in azoto liquido, sono state misurate le concentrazioni di alcune classi di polifenoli (oleuropeina, idrossitirosolo, tirosolo) (Fig. 12). Sulla base di questi dati sono state selezionate tre delle otto varietà campionate, Cassanese, Nocellara del Belice e Tonda dolce, rispettivamente ad alto, medio e basso contenuto di fenoli totali nel frutto (Fig. 12).
 - b. campioni di RNA totale di drupe di olivo, estratti presso l'Istituto di Genetica Agraria del CNR di Perugia ed appartenenti a quattro varietà (Coratina, Rosciola, Dolce D'Andria, Tendellone), selezionate per concentrazioni differenziali di polifenoli a livello del frutto (Fig. 13). I campioni di drupe appartenenti alle quattro varietà scelte sono stati raccolti in 10 stadi successivi di maturazione, in base alle variazioni osservate nel colore del frutto (Fig. 14). Le analisi trascrizionali sono state effettuate sui campioni relativi a tre stadi di maturazione per ciascuna varietà (Tab. 3).

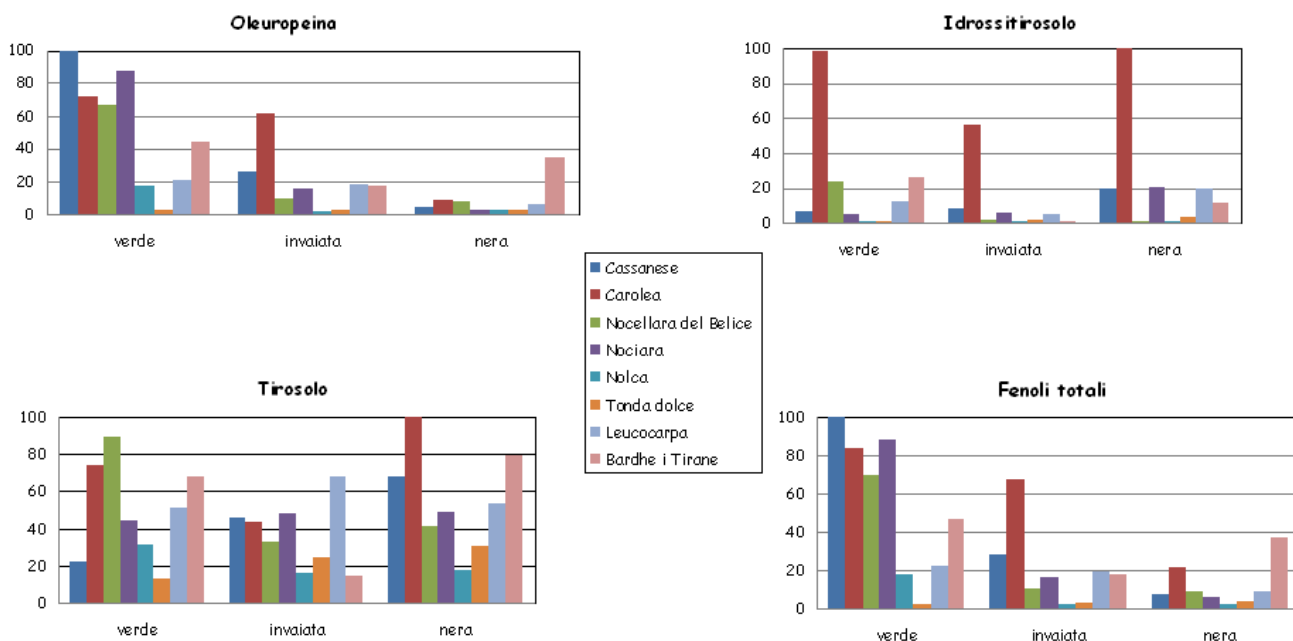


Fig. 12: Analisi comparativa del contenuto di composti fenolici (oleuropeina, idrossitirosole, tirosolo e fenoli totali) in otto varietà di olivo (vedi legenda) in tre stadi successivi di maturazione del frutto. I campioni sono stati raccolti ed analizzati, mediante cromatografia HPLC, presso i laboratori del Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia (Arcavacata di Rende, CS).

- Per il sequenziamento 454 di EST di frutto di olivo sono stati utilizzati campioni di RNA totale estratti presso l'Istituto di Genetica Agraria da frutti delle varietà Coratina e Tendellone, negli stadi 1 e 7 di sviluppo del frutto (Fig. 14), che corrispondono a 30 “Days After Flowering” (DAF) e 160 DAF, rispettivamente. Le due varietà selezionate esibiscono caratteristiche qualitative differenti soprattutto relativamente al contenuto in secoiridoidi oleosidi all'interno del frutto (Fig. 15). Gli stadi di sviluppo analizzati delimitano la fase di crescita che precede la maturazione vera e propria del frutto. Relativamente alle caratteristiche morfologiche dei frutti campionati (Fig. 14), allo stadio 30 DAF il frutto è ancora piccolo e di colore verde; allo stadio 160 DAF il frutto ha raggiunto dimensioni, peso e forma definitivi (Conde et al, 2008) ed ha iniziato a cambiare colore (dal verde al violaceo).

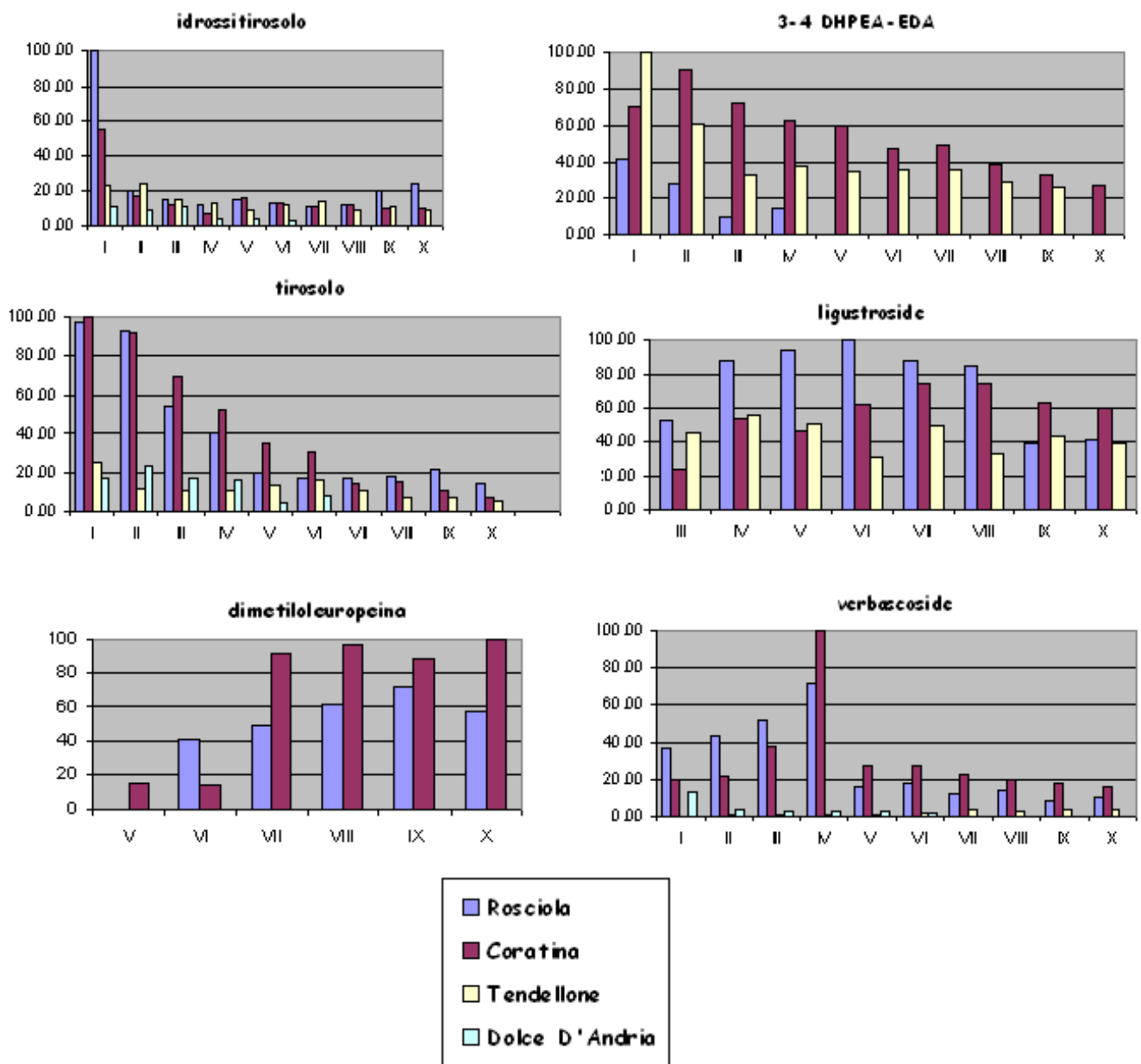


Fig. 13: Analisi quantitativa di composti fenolici nei frutti di quattro varietà di olivo in dieci stadi di maturazione (I-X). Le concentrazioni di ciascun composto, ottenute in collaborazione con l'Istituto di Genetica Agraria del CNR di Perugia, sono riportate in valori percentuali.

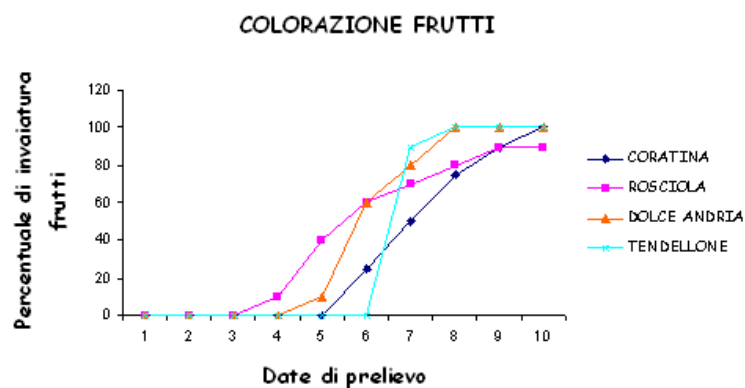


Fig. 14: Percentuale di drupe inviate in dieci stadi successivi di maturazione.

VARIETA'	STADIO	DATE DI PRELIEVO
Coratina	1°	21/07/06
	4°	11/9/2006
	8°	7/11/2006
Rosciola	2°	8/8/2006
	4°	11/9/2006
	8°	7/11/2006
Dolce D'Andria	3°	24/08/06
	4°	11/9/2006
	8°	7/11/2006
Tendellone	1°	21/07/06
	4°	11/9/2006
	8°	7/11/2006

Tab. 3: Stadi di maturazione e date di prelievo dei campioni di drupe di olivo utilizzati per le analisi di qRT-PCR.

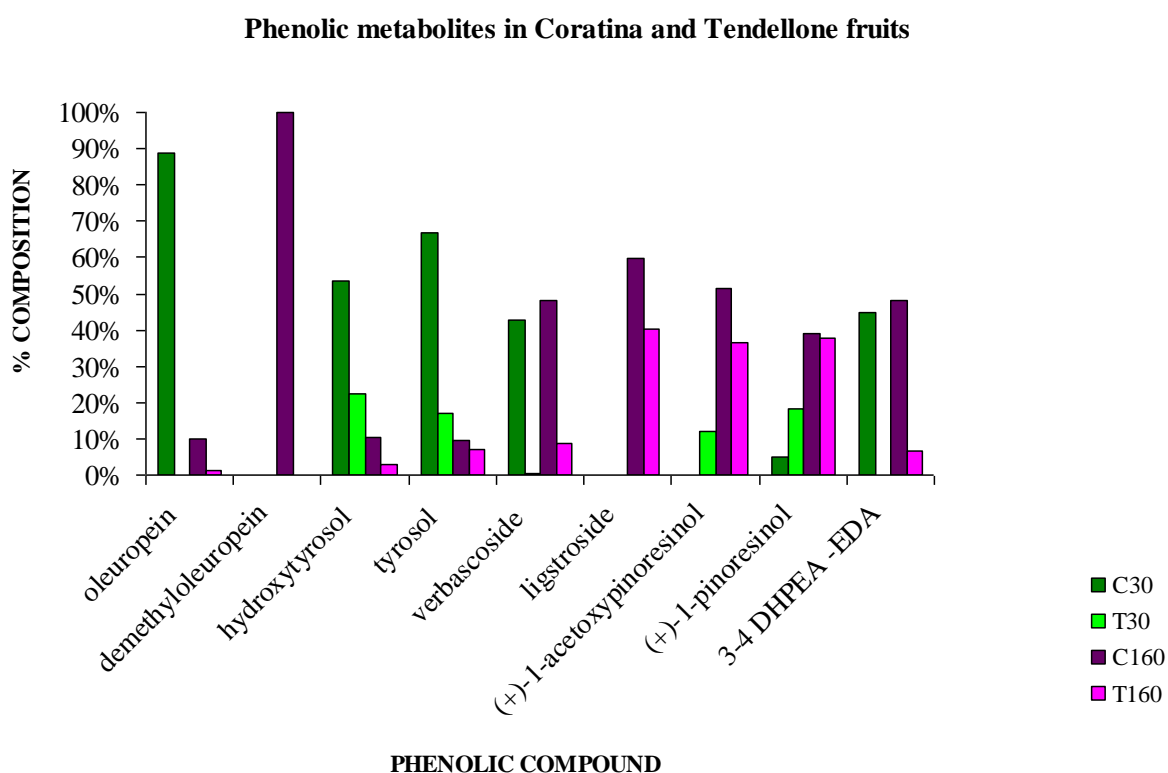


Fig.15 : Composizione percentuale di varie classi di polifenoli nei frutti delle varietà Coratina e Tendellone all'inizio (C30 e T30) ed alla fine (C160 e T160) dello sviluppo del frutto (dati prodotti in collaborazione con l'Istituto di Genetica Agraria del CNR di Perugia).

4.1.2 Fragola

- Per l'identificazione e la caratterizzazione strutturale dei geni *cry* sono state utilizzati campioni di foglie, liofilizzate o congelate a -80°C , raccolte da piantine appartenenti alla cv. Queen Elisa, una varietà coltivata al Nord (Forlì).
- Per le analisi comparative di *transcript profiling* dei geni *cry*, sono stati utilizzati campioni di frutti congelati a -80°C ed appartenenti a tre *cultivar*, Camarosa, 99.163.14 e Onda. Tali campioni sono stati raccolti in cinque stadi progressivi di maturazione: due stadi verdi (G1 e G2), lo stadio bianco (W), lo stadio "turning" (T), lo stadio rosso maturo (R). Le tre *cultivar* di fragola sono state scelte sulla base della loro differenziale composizione in flavonoidi, i composti fenolici più rappresentati nel frutto (Fig. 16). Analisi cromatografiche e misure spettrofotometriche hanno dimostrato che i frutti rossi della cv. Camarosa sono quelli a più elevato contenuto di antocianine, mentre quelli della cv. 99.163.14 presentano concentrazioni intermedie di antocianine e relativamente elevate di flavan-3-oli e proantocianidine; infine, i frutti maturi della cv. Onda contengono concentrazioni relativamente basse di tutte le classi di flavonoidi quantificate (Fig. 16).

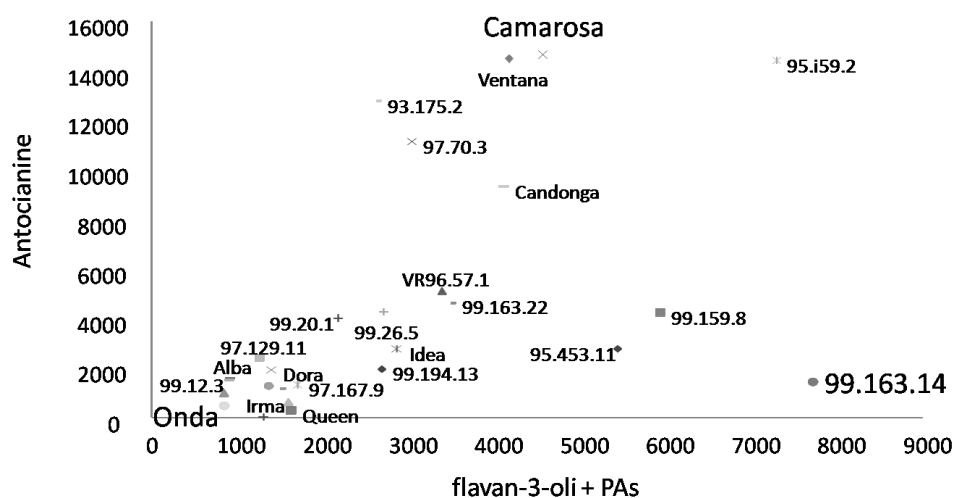




Fig. 16: Rappresentazione grafica del contenuto di antocianine, flavan-3-oli e proantocianidine (PAs) nei frutti rossi maturi di differenti varietà di fragola, quantificati mediante LC-QTOF-MS (*Liquid Chromatography-Quadrupole Time Of Flight-Mass Spectrometry*), presso "Plant Research International" (Wageningen, Olanda). I valori riportati nel diagramma sono misure di intensità relativa dei picchi registrati negli spettri dei vari composti per ciascuna varietà.

4.2 Sequenziamento 454 di EST di frutto di olivo

Con il proposito di esplorare il trascrittoma del frutto di olivo (*Olea europaea* L.) ed analizzare in maniera comparativa i pattern trascrizionali dei frutti di Coratina e Tendellone, all'inizio ed alla fine della fase di crescita del frutto, campioni di RNA totale sono stati estratti da pool di frutti appartenenti ad entrambe le varietà, e raccolti 30 e 160 DAF. A partire dai quattro campioni di RNA totale, mediante la strategia SMART (Clontech), sono state allestite quattro collezioni di cDNA arricchite in molecole *full-length* (C30, C160, T30, T160).

5 µg di ciascuna collezione di cDNA sono stati sequenziati mediante la tecnologia di *pyrosequencing* Life Science 454 (piattaforma GS-FLX, Roche; Margulies et al., 2005). Tale strategia ha permesso di caratterizzare tra 52 e 77 mila sequenze di cDNA totali, corrispondenti ad un numero di nucleotidi totali compreso tra 11 e 17 milioni (Tab. 4). La lunghezza media delle sequenze caratterizzate è compresa tra 217 e 224 bp.

		TOTAL SEQUENCES		TOTAL NUCLEOTIDES (Mb)	
		cultivar		cultivar	
developmental stage		Coratina	Tendellone	Coratina	Tendellone
	30 DAF	51,659	71,112	11.21	15.97
	160 DAF	61,488	77,224	13.77	17.13

Tab. 4: Dati grezzi relativi al numero totale di nucleotidi e di sequenze di cDNA caratterizzate mediante sequenziamento 454 per ciascuna delle quattro popolazioni di cDNA, allestite da pool di mRNA estratti dai frutti di Coratina e Tendellone all'inizio (30 DAF) ed alla fine (160 DAF) dello sviluppo del frutto.

I dati di sequenza “grezzi” sono stati analizzati, in collaborazione con un gruppo di bioinformatici dell'Università di Napoli, con l'ausilio di software bioinformatici specifici e automatizzati, che mascherano le ridondanze e permettono il *clustering* e l'assemblaggio delle EST caratterizzate. Il processamento *in silico*

delle sequenze grezze, o ParPESTs (*Parallel Processing of ESTs*), ha restituito in *output* circa 76.000 sEST (*singleton*) di lunghezza media pari a circa 179 nt, e 27.000 TC (*tentative consensus sequence*) di lunghezza media pari a 355 nt (Tab. 5).

I TC ed i *singleton* ottenuti sono stati analizzati mediante programmi come il BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), che permettono la ricerca di eventuali sequenze omologhe nelle banche dati e, di conseguenza, l'eventuale annotazione funzionale delle sequenze lette: sono stati così annotati complessivamente 13373 sEST e 8920 TC.

ASSEMBLING

sESTs	Number sequences	75.570
	Avarage length (nts)	179,35
	Min seq length	36
	Max seq length	446
ESTs in TCs	Number sequences	185.913
	Avarage length (nts)	239,47
	Min seq length	101
	Max seq length	412
TCs	Number sequences	26.563
	Avarage length (nts)	354,93
	Min seq length	102
	Max seq length	4.916

Tab. 5: Numero di *singletons* (sESTs) e *tentative consensus sequences* (TCs) ottenuti dal processamento *in silico* delle sequenze di cDNA caratterizzate mediante *pyrosequencing* 454.

L'abbondanza dei trascritti assemblati in TC e provenienti da ciascuna delle quattro collezioni di cDNA è stata comparata applicando il test statistico R (Stekel et al., 2000). Il parametro R misura quanto le differenze osservate nel numero di trascritti tra popolazioni di cDNA differenti siano statisticamente significative, ossia dovute ad effettiva eterogeneità dei campioni confrontati, piuttosto che a variabili sperimentali. Imponendo $R > 8$ (cui corrisponde il 98% di veri positivi) e selezionando le differenze di almeno tre volte ("*fold change*" ≥ 3) nel numero di trascritti tra campioni differenti sono stati ottenuti 2942 TC totali. Tra i TC complessivi che

hanno superato i filtri imposti, 1627 sono annotati e 1315, invece, non possiedono sequenze omologhe nelle banche dati.

Il confronto del numero di EST assemblate in TC differenzialmente trascritti nei quattro campioni di frutti analizzati, filtrati per $R > 8$ e per un “*fold change*” ≥ 3 , ha evidenziato nei frutti di C160 un pattern trascrizionale significativamente differente da quello degli altri tre campioni analizzati (Fig. 17). Inoltre, la cv. Coratina ha mostrato una regolazione genica trascrizionale più marcata durante lo sviluppo del frutto, rispetto alla cv. Tendellone. Un numero di geni più elevato nella cv. Coratina rispetto a quello della cv. Tendellone mostra, infatti, livelli di trascrizione differenziali nei due stadi di sviluppo considerati (Fig. 18). I trascritti più abbondanti nei frutti di C30 appartengono a 1045 TC differenti, contro i 774 TC più rappresentati nei frutti di T30 (Fig. 18A). La differenza tra le due *cultivar* si accentua quando si considera il numero di TC trascritti preferenzialmente nei frutti 160 DAF, di gran lunga superiore in Coratina (Fig. 18B).

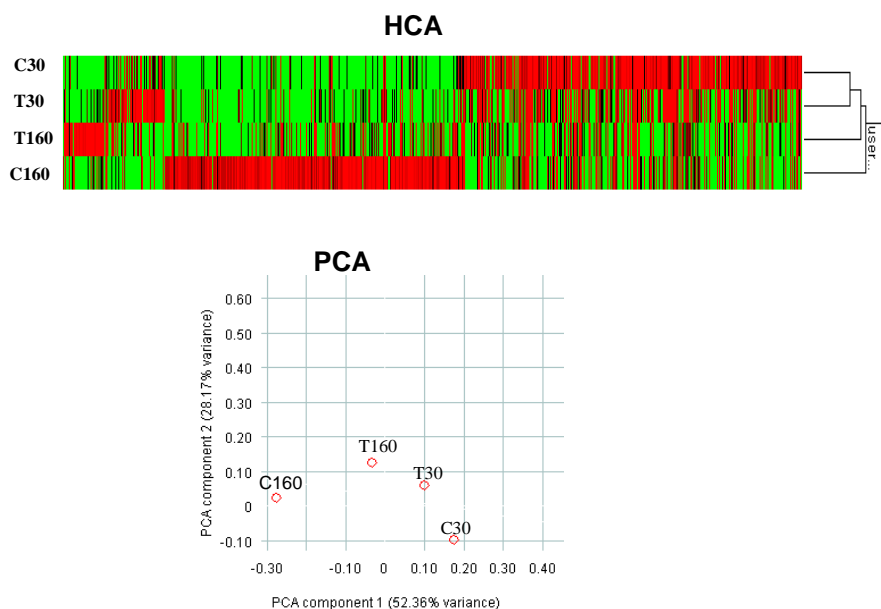


Fig. 17: Confronto tra quattro popolazioni di trascritti, isolati dai frutti delle cv. Coratina e Tendellone 30 DAF (C30 e T30, rispettivamente) e 160 DAF (C160 e T160, rispettivamente), mediante analisi HCA (*High Clustering Analysis*) e PCA (*Principal Component Analysis*).

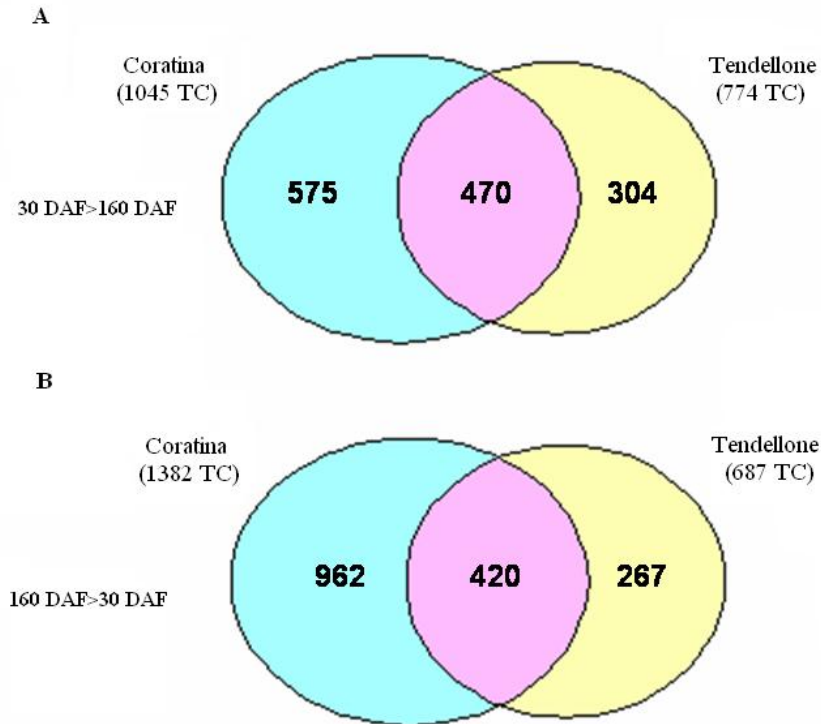


Fig. 18: Numero di TC preferenzialmente trascritti all'inizio (**A**, 30 DAF > 160 DAF) ed alla fine (**B**, 160 DAF > 30 DAF) dello sviluppo del frutto nelle cv. Coratina e Tendellone. In **A** ed in **B**, sono indicati nell'area rosa, il numero di TC più rappresentati contemporaneamente in entrambi i genotipi; nell'area celeste, il numero di TC più rappresentati in Coratina; nell'area gialla, il numero di TC più rappresentati in Tendellone.

Per alcuni geni, comunque, sono stati individuati profili trascrizionali comuni durante lo sviluppo dei frutti di entrambe le varietà testate (Fig. 18): sia in Coratina che in Tendellone, infatti, 470 TC risultano più rappresentati all'inizio dello sviluppo del frutto (Fig. 18A), mentre 420 TC risultano trascritti preferenzialmente al termine dello sviluppo del frutto (Fig. 18B). L'analisi funzionale dei profili trascrizionali comuni ad entrambe le varietà, basata sulle annotazioni dei TC disponibili, ha permesso di identificare geni regolati durante la fase di crescita in cui il frutto di olivo subisce una serie di importanti cambiamenti fisiologici e morfologici, che ne definiscono forma, peso e contenuto in olio. I TC trascritti differenzialmente nei due stadi di sviluppo del frutto di entrambe le *cultivar* sono stati raggruppati in 13 categorie funzionali (Fig. 19). Tra i due stadi di sviluppo dei frutti di Coratina e Tendellone sono state riscontrate divergenze piuttosto interessanti relativamente all'espressione di geni coinvolti nella fotosintesi, nella biosintesi di proteine

strutturali e terpenoidi, nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi, nella biosintesi di flavonoidi e vitamine (Fig. 19).

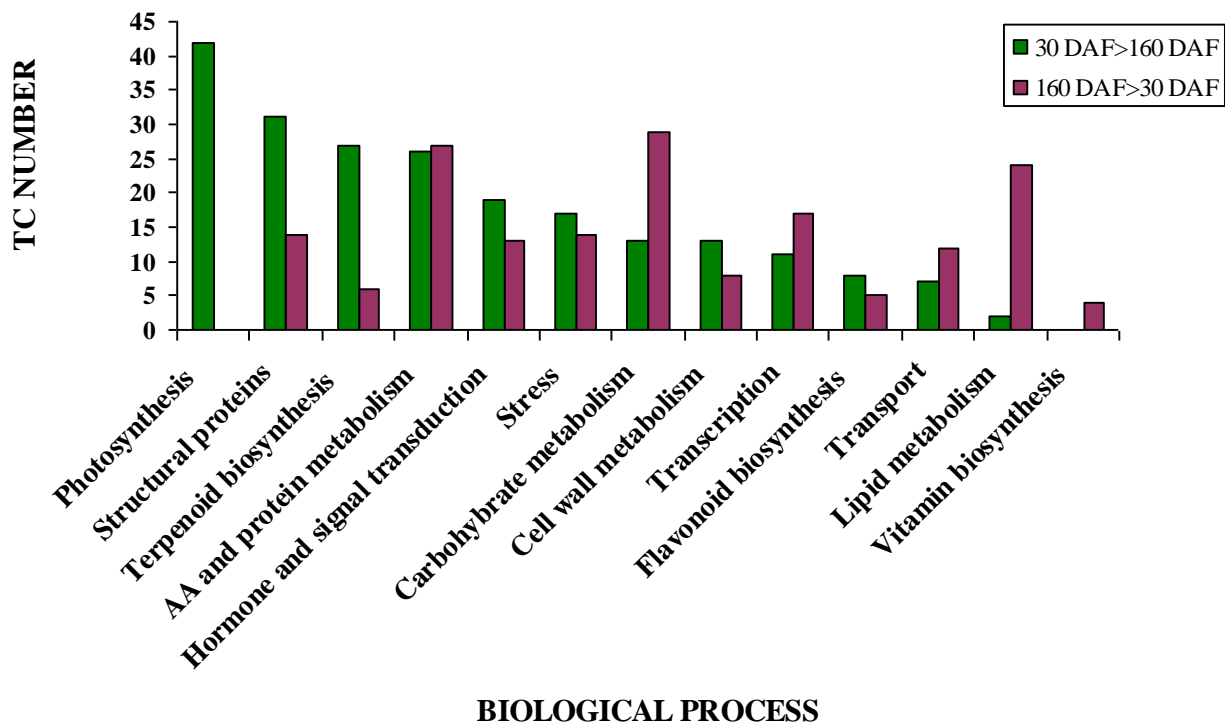


Fig. 19: TC trascritti differenzialmente all'inizio (30 DAF) ed alla fine (160 DAF) dello sviluppo del frutto nelle varietà Coratina e Tendellone, classificati in base alla loro annotazione funzionale.

- Fotosintesi e metabolismo dei carboidrati.** Nel primo stadio di sviluppo del frutto, in entrambi i genotipi, sono risultati abbondantemente trascritti i geni associati alla fotosintesi (Fig. 19), deputati, in particolare, alla fotopercezione (biosintesi delle clorofille), alla fissazione del carbonio (ciclo di Calvin), alla produzione di energia (fosforilazione ossidativa). Nello stadio finale di sviluppo del frutto, invece, è stato osservato un livello piuttosto elevato di trascrizione di geni coinvolti nel catabolismo dei carboidrati (glicolisi, ciclo degli acidi tricarbossilici) e nel metabolismo di fruttosio, mannosio e galattosio.
- Metabolismo dei lipidi.** A partire da 90 DAF fino alla fine dello sviluppo del frutto, all'interno delle cellule del mesocarpo delle drupe d'olivo si verifica un'intensa attività di biosintesi degli acidi grassi, che induce l'accumulo progressivo di olio (Conde et al., 2008). A conferma di ciò, il

confronto tra i profili trascrizionali dei frutti di Coratina e Tendellone nei due stadi di sviluppo, ha mostrato una trascrizione dei geni deputati alla biosintesi degli acidi grassi di gran lunga superiore nei frutti 160 DAF (Fig. 19).

- **Proteine strutturali.** Un elevato numero di TC, caratterizzati nei frutti 30 DAF, è associato a geni per proteine ribosomali, acquaporine, istoni, citocromi P450, tubuline. Una trascrizione maggiore di questi geni all'inizio dello sviluppo del frutto (Fig. 19) è associabile agli intensi e rapidi processi di divisione cellulare che promuovono la crescita delle dimensioni e del peso della drupa (Conde et al., 2008).
- **Biosintesi dei terpenoidi.** Marcate differenze tra i due stadi di sviluppo del frutto sono state scoperte nei pattern trascrizionali di geni coinvolti nella biosintesi dei terpenoidi (Fig. 19). Tali differenze riguardano prevalentemente sequenze specifiche per enzimi strutturali delle *pathway* che sintetizzano i precursori di tutti i terpenoidi, il dimetilallidifosfato e l'isopentenildifosfato (Fig. 20). Trascritti associati ad enzimi della via plastidiale non-mevalonato (non-MVA), sono stati caratterizzati quasi esclusivamente, ed in numero elevato, nei campioni C30 e T30 (Fig. 20). La *pathway* non-MVA, scoperta di recente nelle piante, porta alla sintesi di varie classi di terpenoidi, prevalentemente emiterpeni, monoterpeni, diterpeni e carotenoidi (Dubey et al., 2003). Tale via è alternativa a quella acetato-mevalonato (Ac-MVA; Fig. 20), che sintetizza prevalentemente steroli, sesquiterpeni e ubiquinoni nel citoplasma e nei mitocondri (Dubey et al., 2003). Le ragioni della coesistenza nelle piante di due vie differenti per la sintesi di metaboliti comuni in compartimenti subcellulari separati non sono ancora chiare. La compartimentalizzazione delle due vie, in realtà, non preclude l'interscambio di metaboliti, ma la natura di questo *crosstalk* è sconosciuta (Eisenreich et al., 2001). Una maggiore trascrizione di sequenze geniche specifiche per enzimi della *pathway* non-MVA (Fig. 20) suggerisce

che all'inizio dello sviluppo del frutto i precursori dei terpenoidi vengono sintetizzati preferenzialmente attraverso la via plastidiale. L'identificazione nei frutti 30 DAF di EST per enzimi della via Ac-MVA indica che tale *pathway* è comunque espressa, seppur con minore intensità, anche all'inizio dello sviluppo del frutto. Nei campioni C160 e T160, al contrario, la sintesi dei precursori dei terpenoidi sembra avvenire quasi esclusivamente attraverso la via Ac-MVA (Fig. 20): livelli di trascrizione significativamente elevati risultano associati, in particolare, agli enzimi difosfomevalonato decarbossilasi (4.1.1.33) ed isopentenildifosfato-delta-isomerasi (5.3.3.2), mentre le EST associate alla via plastidiale sono molto scarse e specifiche solo per pochi enzimi. La regolazione differenziale delle vie biosintetiche dei terpenoidi nei frutti all'inizio ed alla fine della “maturazione verde” (Ryan et al., 1999) potrebbe essere giustificata dal fatto che, mentre nelle olive piccole e verdi, i cloroplasti presenti nelle cellule dell'epicarpo sono ancora fotosinteticamente attivi, alla fine della fase di crescita, quando il colore dell'epicarpo del frutto comincia a cambiare (150 DAF), l'attività fotosintetica plastidiale cessa e le clorofille vengono progressivamente sostituite dalle antocianine (Conde et al., 2008).

Ulteriori differenze tra i due stadi di sviluppo del frutto riguardano l'espressione di geni per la biosintesi degli indolo alcaloidi, una classe di terpenoidi di grande interesse farmacologico. Tali geni appaiono più espressi all'inizio dello sviluppo del frutto in entrambi i genotipi studiati (Fig. 21). Un numero particolarmente elevato di EST nei frutti 30 DAF è risultato associato a due enzimi (1.14.11.20 e 3.1.1.78) coinvolti nella biosintesi dei precursori di due diversi gruppi di indolo alcaloidi (Fig. 21), uno comprende vindolina, vinblastina e vincristina, note per le loro proprietà chemioterapiche (inibiscono l'attività proliferativa delle cellule tumorali); l'altro include ajmalina e sarpagina, aventi proprietà antiaritmiche e antitumorali, rispettivamente. Alcune sequenze per l'enzima (3.1.1.78) che

sintetizza l'epivellosimina, precursore comune degli alcaloidi ajmalina e sarpagina, sono state identificate unicamente nei frutti della cv. Coratina, ed in maniera stadio-specifica (Fig. 21).

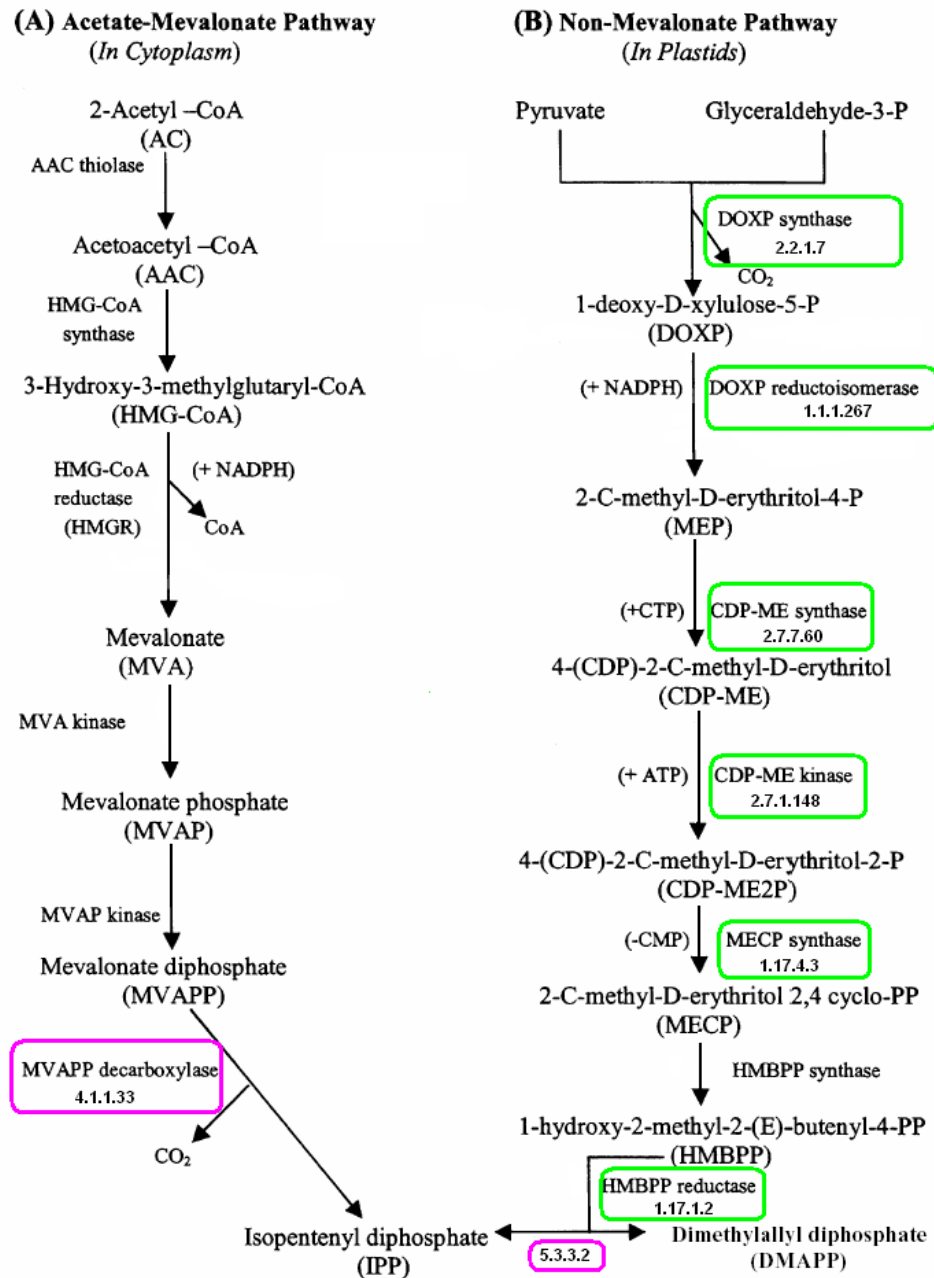


Fig. 20: Biosintesi dei terpenoidi (Dubey et al., 2003). Nelle piante esistono due vie metaboliche differenti per la biosintesi dei terpenoidi, la via AC-MVA nel citoplasma e nei mitocondri e la via non-MVA nei cloroplasti. Livelli particolarmente elevati di trascritti per gli enzimi della via non-MVA, evidenziati con i box verdi, sono stati rilevati nei frutti 30 DAF; due geni strutturali della via Ac-MVA (marcati con i box fucsia) risultano, invece, più espressi nei frutti 160 DAF.

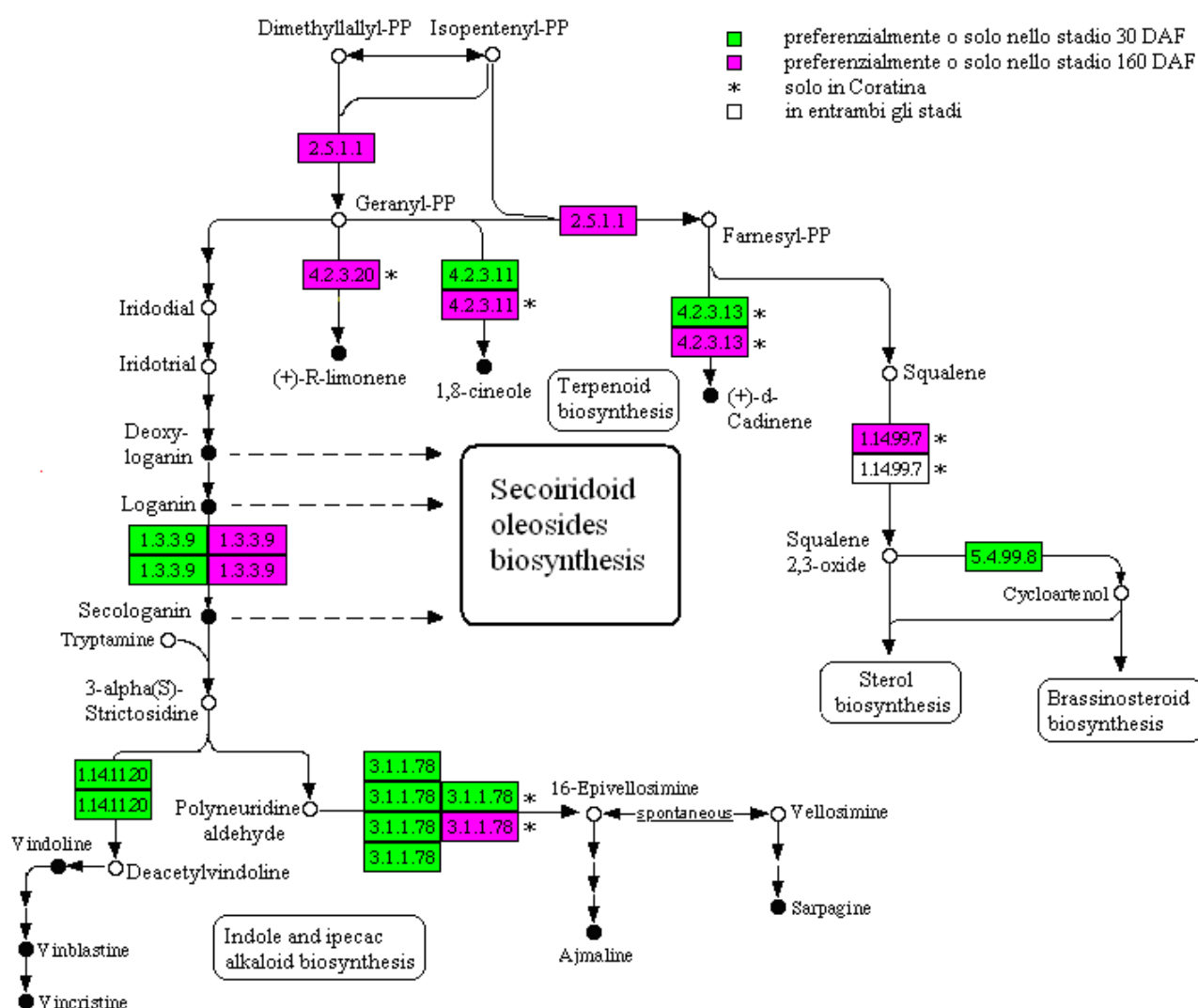


Fig. 21: Pathway dei terpenoidi. Sono indicati i TC più rappresentati all'inizio (box in verde) ed alla fine dello sviluppo del frutto (box in fucsia) in entrambi i genotipi, o specifici della cv. Coratina allo stadio 30 DAF o 160 DAF (box con l'asterisco in verde o in fucsia, rispettivamente) o in entrambi gli stadi di sviluppo (box bianchi con l'asterisco).

L'enzima deputato alla biosintesi della secologanina (1.3.3.9), precursore degli idolo alcaloidi, ha mostrato un'espressione regolata durante lo sviluppo del frutto: quattro isoforme geniche subiscono, infatti, una trascrizione preferenziale a 30 o a 160 DAF (Fig. 21). La secologanina ed altri intermedi della stessa *pathway* (7-deossiloganina e loganina), sono stati identificati come precursori di oleosidi secoiridoidi in varie specie appartenenti alla famiglia delle Oleaceae, anche se le vie biosintetiche di questi composti non sono ancora note nel dettaglio (Jensen et al., 2002; Figg. 21 e 2).

Per altri terpenoidi non alcaloidi, che contribuiscono positivamente alle caratteristiche qualitative dei frutti, sono stati individuati trascritti differenziali tra i due stadi di sviluppo e tra i due genotipi studiati. L'analisi comparativa tra i due genotipi ha evidenziato la presenza esclusiva nei campioni C160 di sequenze specifiche per il (+)-R-limonene, il (+)-delta-cadinene e l'1,8-cineolo (Fig. 21). Quest'ultimo, in particolare, più comunemente noto col nome di eucaliptolo (dal nome della specie *Eucalyptus* in cui è stato identificato), è largamente utilizzato come aromatizzante, nella cosmesi ed in medicina: presenta, infatti, proprietà antidolorifiche ed antiinfiammatorie e, di recente, saggi *in vitro* hanno dimostrato la sua capacità di indurre l'apoptosi in cellule leucemiche umane (Moteki et al., 2002). Per il (+)-delta-cadinene nei frutti di Coratina sono stati identificati trascritti stadio-specifici (Fig. 21): tale composto è il precursore di alcuni sesquiterpeni (gossipolo e derivati) coinvolti nei meccanismi di difesa contro i patogeni (Townsend et al., 2005). Infine, il (+)-R-limonene è il monoterpenoide ciclico più abbondante in natura ed uno dei composti più utilizzati nell'industria alimentare per l'aroma e la fragranza che lo caratterizzano (Bicas et al., 2008). Un forte interesse industriale per questo composto ed i suoi derivati è da attribuire alle sue proprietà biologiche *in vivo* contro la formazione e la progressione di alcune neoplasie, nonchè a favore della regressione di tumori maligni (Bicas et al., 2008).

Un'ulteriore differenza emersa dal confronto tra i profili trascrizionali associati alla *pathway* dei terpenoidi riguarda due TC per l'enzima squalene monossigenasi (1.14.99.7), presenti unicamente nel trascrittoma dei frutti di Coratina, uno nello stadio 160 DAF, l'altro in entrambi gli stadi di sviluppo (Fig. 21). Infine, un'isoforma specifica dell'enzima (5.4.99.8) che sintetizza il cicloartenolo, precursore comune degli steroli e dei brassinosteroidi, è risultato espresso preferenzialmente all'inizio dello sviluppo del frutto (Fig. 21).

• **Biosintesi dei flavonoidi.** Tra i trascrittomi di frutto di olivo caratterizzati sono state riscontrate differenze piuttosto interessanti anche nei livelli di

espressione di geni strutturali associati alla biosintesi dei flavonoidi (Fig. 19). Nei frutti di Coratina e Tendellone all'inizio dello sviluppo è stato isolato un numero significativamente elevato di trascritti specifici per gli enzimi flavonol sintasi (1.14.11.9), che catalizza la biosintesi dei flavonoli, e diidroflavonol-4-reduttasi (1.1.1.219), che sintetizza le leucoantocianidine, precursori delle antocianine e delle proantocianidine (Fig. 22). Nei campioni C160 e T160, invece, sono state identificate numerose EST per la leucoantocianidina diossigenasi (1.14.11.19) e l'antocianidina-3-O-glicosiltransferasi (2.2.1.115), appartenenti alla via biosintetica delle antocianine (Fig. 22). Per questi due enzimi, poco o per nulla espressi nei frutti ancora piccoli e verdi, sono state individuate sequenze varietà-specifiche nei frutti 160 DAF. Alla fine dello sviluppo del frutto, infine, una quantità relativamente ampia di EST specifica per l'enzima camferolo-3-O-galattosiltransferasi (2.4.1.234). Altre sequenze genotipo-specifiche codificano per enzimi della *pathway* delle lignine (Fig. 22).

I corredi trascrizionali di frutto di olivo confrontati hanno esibito ulteriori caratteristiche differenziali nell'espressione di sequenze omologhe a geni di *Arabidopsis*, coinvolti nella regolazione della biosintesi e dei pattern di accumulo dei flavonoidi nei semi (Tab. 5). Questi geni regolatori, chiamati “*transparent testa*” (*tt*), sono stati scoperti di recente in mutanti di *Arabidopsis* caratterizzati da anomalie fenotipiche relative al colore dei semi (Lepiniec et al., 2006). Nei frutti di olivo analizzati sono state isolate sequenze di cDNA *tt-like* sia stadio- che genotipo-specifiche (Tab. 5). In entrambe le varietà studiate, tre TC omologhi al gene *tt12* di *Arabidopsis* sono risultati trascritti prevalentemente nei frutti 30 DAF e uno solo nei frutti 160 DAF (Tab. 5). Alcune sequenze di cDNA per proteine *TT12-like*, inoltre, sono espresse solo allo stadio 30 DAF ed in maniera genotipo-specifica (Tab. 5). L'analisi fenotipica dei mutanti *tt12* di *Arabidopsis* ha suggerito che questa proteina funziona *in vivo* da trasportatore di flavan-3-oli (monomeri precursori delle

proantocianidine) glicosilati, all'interno dei vacuoli citoplasmatici (Marinova et al., 2007). Per TT8, una proteina che regola l'espressione dei geni strutturali per la biosintesi delle proantocianidine, sono state identificate EST solo nei campioni 30 DAF. Un TC specifico per la proteina TTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1), che interagisce con TT8 nel promuovere l'accumulo di proantocianidine nei semi di *Arabidopsis*, è trascritto solo in C30 (Tab. 5).

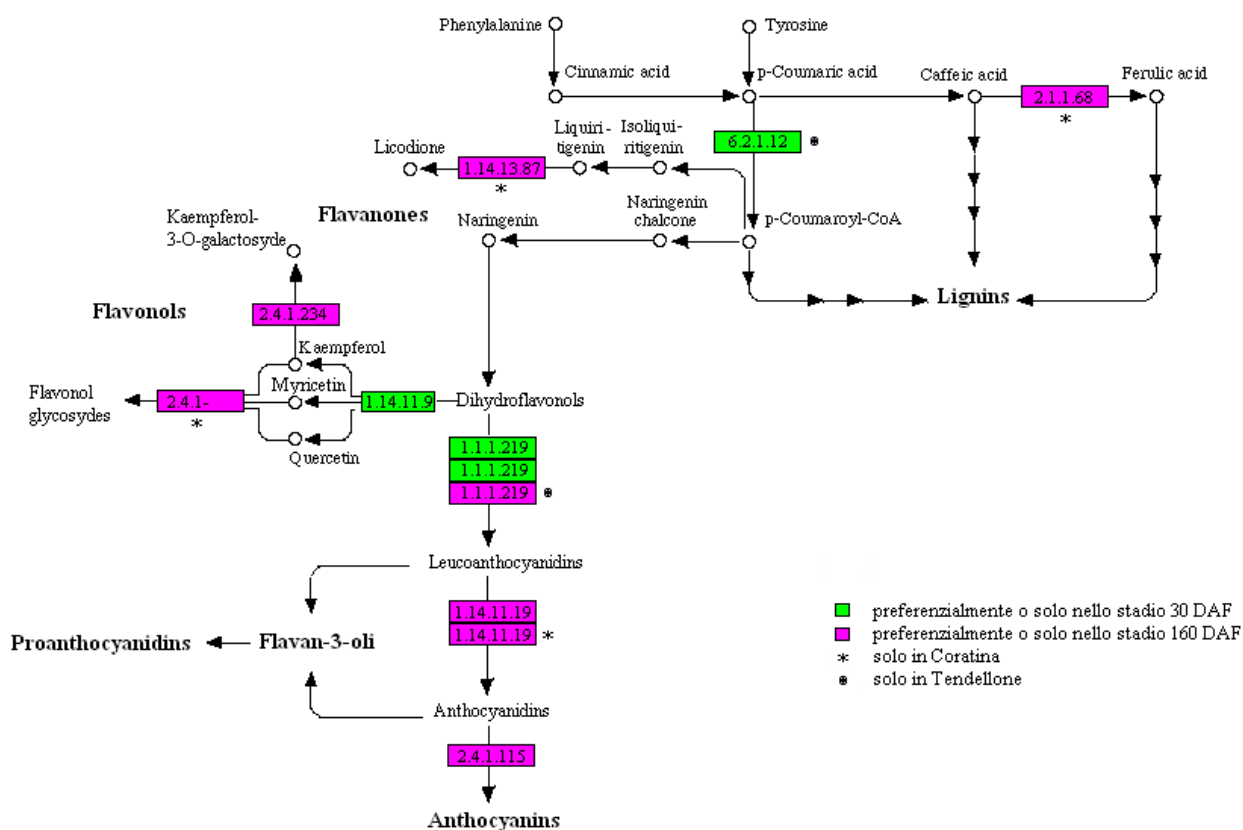


Fig. 22: Pathway dei fenilpropanoidi. Sono indicati i TC più rappresentati all'inizio (30 DAF) ed alla fine dello sviluppo del frutto (160 DAF) in entrambe le varietà, nonché i TC varietà-specifici (vedi legenda).

TCs	SAMPLES			
	C30	C160	T30	T160
TT12	50	10	101	6
TT12	47	6	42	4
TT12	54	11	15	0
TT12	0	36	10	64
TT12	0	78	13	271
TT12	4	0	0	0
TT8	4	0	0	0
TT8	8	0	9	0
TTG1	4	0	0	0

Tab. 5: Numero di EST omologhe a geni di *Arabidopsis* per proteine TRANSPARENT TESTA, identificate nei frutti di Coratina e Tendellone 30 DAF (C30 e T30) e 160 DAF (C160 e T160).

Pur mancando studi sui profili di espressione dei geni per le varie classi di flavonoidi durante lo sviluppo della drupa d'olivo (in cui i flavonoidi sono presenti in concentrazioni relativamente inferiori rispetto ad altre classi fenoliche), le differenze nei livelli trascrizionali di geni strutturali e regolatori della *pathway* dei flavonoidi tra gli stadi 30 DAF e 160 DAF concorderebbero con i dati ottenuti in altre specie da frutto, come fragola e mirtillo (Jaakola et al., 2002; Halbwirth et al., 2006; Almeida et al., 2007). La trascrizione preferenziale di geni per la sintesi dei precursori dei flavan-3-oli, dei loro trasportatori vacuolari *tt12-like* e dei geni regolatori *tt8* e *ttg1* nei frutti 30 DAF è conforme, infatti, all'accumulo di flavan-3-oli e proantocianidine nel frutto di fragola negli stadi verdi di maturazione (Halbwirth et al., 2006). Livelli di trascritti particolarmente elevati per geni coinvolti nella biosintesi di flavonoli glicosidi ed antocianine nei frutti 160 DAF concordano, d'altronde, con l'accumulo di questi pigmenti negli stadi “*turning*” e “rosso” di maturazione del frutto di fragola, rispettivamente (Halbwirth et al., 2006).

In definitiva, il sequenziamento massivo di sequenze di cDNA da frutto di olivo, mediante la tecnologia Life Science 454, ha permesso l'allestimento del primo database di EST di olivo. Nel panorama assai scarso di informazioni di sequenza disponibili per la specie *Olea*, questo database, che include più di 260.000 sequenze, rappresenta un traguardo importante della ricerca su olivo ed, allo stesso tempo, una solida base di partenza per ulteriori studi molecolari in questa specie. La piattaforma allestita include sequenze espresse all'inizio ed alla fine della fase di crescita del frutto: proprio in questa fase, all'interno del mesocarpo, si verifica una serie di modificazioni fisiologiche emblematiche per l'espressione di caratteri qualitativi di grande interesse nel frutto e nell'olio d'oliva (per es. l'accumulo di olio e di antiossidanti fenolici). L'analisi funzionale delle sequenze espresse in maniera differenziale tra i due stadi di sviluppo confrontati ha permesso di identificare geni importanti per la fisiologia dello sviluppo del frutto, coinvolti nella resistenza ai patogeni e ad

altri fattori di stress, nelle biosintesi e nelle cascate di trasduzione dei segnali ormonali, nell'accumulo di acidi grassi e di metaboliti secondari (terpeni, vitamine e flavonoidi) rilevanti per la salute e per le proprietà organolettiche dei frutti e dell'olio d'oliva. Differenze significative tra i pattern di espressione caratteristici di ciascuno dei due stadi di sviluppo, inoltre, concordano con conoscenze già acquisite sulla fisiologia dello sviluppo del frutto: i geni coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi, che si intensifica nel frutto a partire da 90 DAF (Conde et al., 2008), sono risultati di gran lunga più espressi nei frutti 160 DAF. In questi frutti, al contrario, i geni associati alla fotosintesi hanno mostrato livelli di espressione nettamente inferiori; è noto, d'altronde, che cloroplasti e clorofille, ancora fotosinteticamente attivi nelle drupe verdi, tendono progressivamente a scomparire durante lo sviluppo del frutto (Conde et al., 2008). La riduzione del numero di cloroplasti sembra giustificare anche la minore espressione di geni strutturali della via plastidiale non-MVA nei frutti 160 DAF. Sempre in accordo con i dati di letteratura, livelli più alti di trascrizione di geni associati al metabolismo della parete cellulare sembrerebbero correlati con i riarrangiamenti strutturali caratteristici dei processi di espansione cellulare, che promuovono lo sviluppo del mesocarpo (Conde et al., 2008).

Il database di EST di olivo rappresenta una piattaforma piuttosto originale, dal momento che permette il confronto non solo tra due stadi emblematici di sviluppo del frutto di olivo, ma anche tra varietà con caratteristiche qualitative differenti. L'analisi comparativa tra i pattern di trascrizione delle varietà Coratina e Tendellone, durante lo sviluppo del frutto, ha portato all'identificazione di alcuni TC specifici dell'una o dell'altra varietà (Tab. 6). I frutti di Coratina, di qualità superiore a quelli di Tendellone per via di concentrazioni fenoliche superiori e di una maggiore resistenza all'attacco dei patogeni (L. Baldoni, *pers. comm.*), possiedono un corredo più ampio di trascritti unici per proteine associate alla biosintesi e segnalazione ormonale,

alle risposte contro fattori di stress abiotici e, soprattutto, biotici (4 TC Coratina-specifici codificano per “*disease resistance proteins*”), alla biosintesi di terpeni secondari e fenilpropanoidi (Tab. 6).

BIOLOGICAL PROCESS	GENOTYPE	
	Coratina	Tendellone
Hormone metabolism and regulation	13	5
Abiotic and biotic stress	10	4
Cell wall metabolism	9	3
Lipid metabolism	7	7
Terpenoid metabolism	9	0
Phenylpropanoid metabolism	7	3

Tab. 6. Numero di TC varietà-specifici per ciascuna categoria funzionale.

Di particolare interesse appaiono i TC specifici di Coratina associati alla biosintesi di classi di metaboliti secondari, dotati di preziose proprietà biologiche, come vitamine e flavonoidi antiossidanti ed alcune classi di terpeni antitumorali. Ad oggi, la scarsa conoscenza delle *pathway* e dei geni che regolano la biosintesi dei secoiridoidi oleosidi, in *Olea* come in altre specie della famiglia delle Oleaceae, limita fortemente l’analisi dei meccanismi molecolari responsabili dell’accumulo differenziale di questi polifenoli antiossidanti nei frutti delle due varietà studiate. Bisogna considerare, d’altra parte, che percentuali considerevoli di sEST e di TC sequenziati non hanno ottenuto annotazione funzionale. Una più profonda conoscenza dei geni e delle vie metaboliche che presiedono alla biosintesi degli oleosidi, potenti antiossidanti naturali prodotti esclusivamente in olivo e in altre Oleaceae, e la caratterizzazione funzionale delle sequenze non annotate potrebbe permettere l’identificazione di nuovi e specifici *target* molecolari per lo studio dei caratteri qualitativi del frutto e dell’olio d’oliva.

Le=*Lycopersicon esculentum*; Ac=*Adiantum capillus-veneris*; PHR=CDP fotoliasi; 6,4-PHR=fotoliasi 6-4 (Perrotta et al., 2001).

I prodotti di amplificazione del DNA genomico di fragola ed olivo ottenuti sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio (Fig. 24), purificati da gel e clonati all'interno di cellule di *E. coli* competenti.

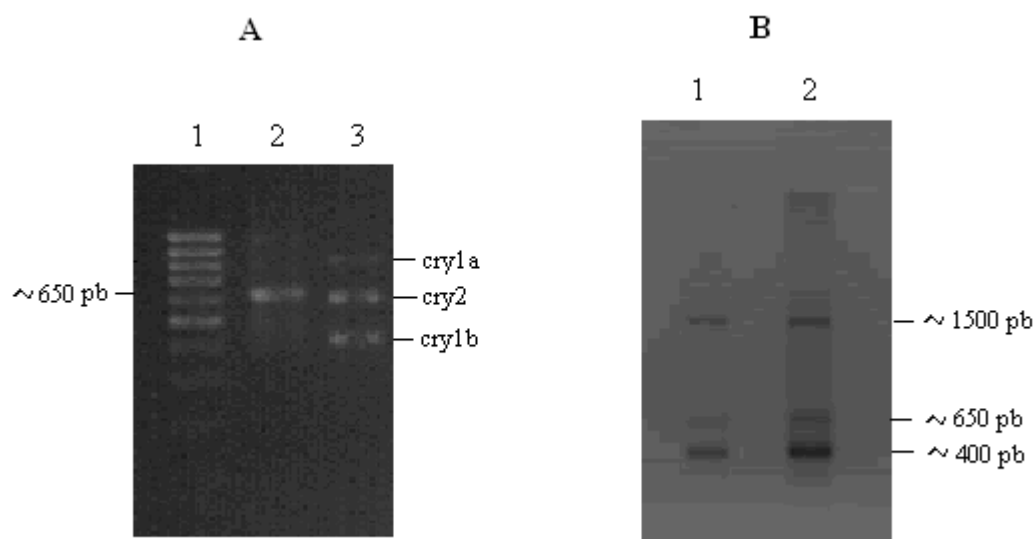


Fig. 24: Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR, ottenuti dall'amplificazione di DNA genomico di fragola *cv Queen* (**A**, pozzetto 2) e di olivo *cv Cassanese* (**B**, pozzetti 1 e 2), con i primer *Cry Univ. up/Cry Univ. dw*. In **A**, le dimensioni dei prodotti ottenuti sono state stimate in base ad un marcatore di peso molecolare (pozzetto 1), mentre nel pozzetto 3 sono stati separati i prodotti di amplificazione del DNA genomico di pomodoro (*L. esculentum*), ottenuti con la stessa coppia di primer degenerati ed utilizzati come controllo positivo. In **B**, le dimensioni dei prodotti di PCR, ottenuti a partire da 50ng (pozzetto 1) e 100 ng (pozzetto 2) di DNA genomico di olivo, sono state stimate in base ad un marcatore molecolare che non compare nella foto.

Il DNA plasmidico estratto dai cloni ricombinanti positivi è stato sequenziato in entrambe le direzioni con i primer *M13 forward* ed *M13 reverse*, scelti all'interno delle regioni fiancheggianti il sito di clonaggio multiplo del plasmide vettore (Fig. 9; Materiali e Metodi). I dati di sequenza sono stati analizzati *in silico* mediante *software*, come FASTA3 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), specifici per la ricerca di similarità nelle principali banche dati di sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche. Elevate percentuali di similarità con sequenze-*cry* di altre specie di piante hanno permesso di identificare due geni in olivo, *cry1-* e *cry2-like*, ed almeno quattro in fragola, un gene *cry1-like* e tre geni *cry2-like*.

Per proseguire nella caratterizzazione della struttura primaria dei geni *cry* in fragola ed olivo sono state adottate strategie di PCR 5' inversa (Siebert et al., 1995) e PCR 3'RACE (Frohman et al., 1998), descritte nella sezione Materiali e Metodi.

Le regioni finora sequenziate dei geni *cry1* di fragola ed olivo, lunghe rispettivamente 2502 pb e 1758 pb, sono state rappresentate graficamente e confrontate con le sequenze omologhe di pisello (*P.sativum*) e pomodoro (*L. esculentum*) (Fig. 25). Il grado di omologia tra le sequenze-*cry1* confrontate è descritto dalle percentuali di identità, significativamente elevate, riportate in Tab. 7.

La distinzione tra regioni codificanti (esoni) e non codificanti (introne, 3'-UTR) nelle sequenze-*cry1* di fragola ed olivo finora caratterizzate, nonché l'identificazione delle esatte giunzioni tra gli esoni 3 e 4 con l'introne tra di essi interposto sono state effettuate mediante allineamento tra sequenze di DNA genomico e sequenze di cDNA. Gli esoni 3 e 4, completamente sequenziati in fragola, codificano per 516 aminoacidi della proteina CRY1; dell'omologo gene *cry1* di olivo è stato sequenziato tutto l'esone 4 e parte dell'esone 3, codificanti per 312 aminoacidi complessivi della proteina corrispondente (Fig. 25).

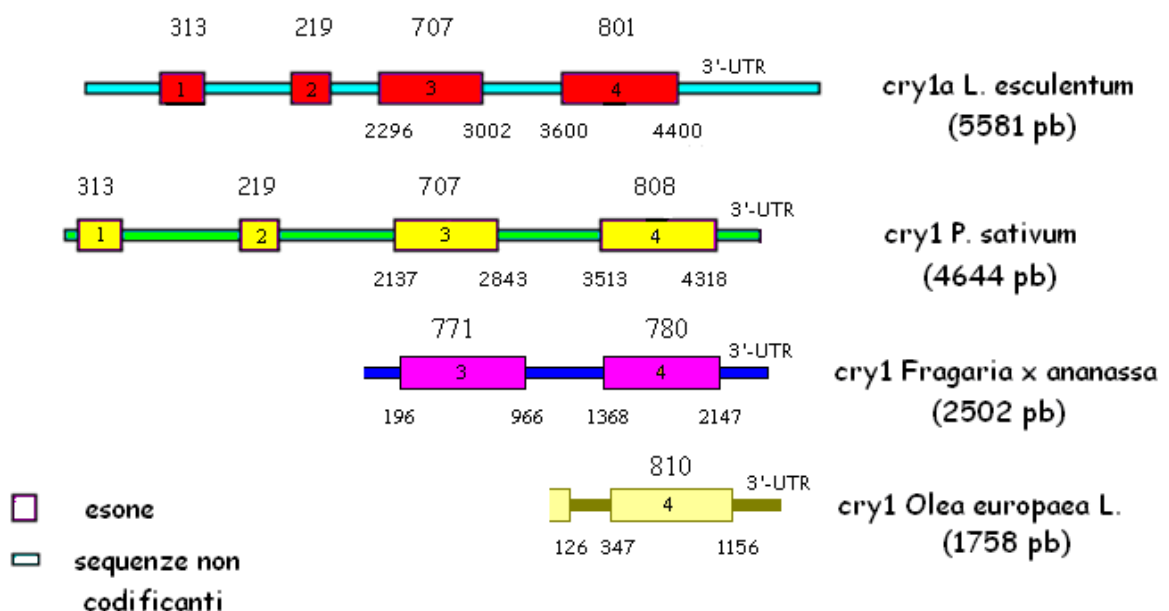


Fig. 25: Rappresentazione grafica del confronto tra le sequenze-*cry1* di fragola ed olivo con le sequenze nucleotidiche dei geni omologhi di *L. esculentum* (AF130424) e *P. sativum* (AY508970), effettuato mediante il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). I numeri sopra i box indicano la lunghezza in pb di ciascun esone, i numeri sotto i box indicano le posizioni nucleotidiche che definiscono i confini degli esoni 3 e 4 e dell'introne tra essi interposto.

<i>cry1</i> <i>F. x ananassa</i>	CRY1A <i>L. esculentum</i>	CRY1 <i>P. sativum</i>	identità
256 ÷ 966	177 ÷ 413		91%
1365 ÷ 2144	413 ÷ 679		60%
259 ÷ 966		178 ÷ 413	91%
1365 ÷ 2144		413 ÷ 682	69%
<i>cry1</i> <i>O. europaea</i>	CRY1A <i>L. esculentum</i>	CRY1 <i>P. sativum</i>	identità
1 ÷ 126	372 ÷ 413		100%
344 ÷ 1153	413 ÷ 679		74%
1 ÷ 126		372 ÷ 413	97%
344 ÷ 1153		413 ÷ 682	66%

Tab. 7: Percentuali d'identità relative al confronto tra le sequenze-*cry1* di fragola ed olivo con le sequenze aminoacidiche delle proteine CRY1 di *P. sativum* (AAO23970) e *L. esculentum* (AAD44161), restituite dal programma BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Mentre in olivo è stato identificato un solo gene *cry2*, meno chiaro è il quadro relativo alla famiglia delle sequenze-*cry2* in fragola. In questa specie, in cui la caratterizzazione di nuovi geni risulta particolarmente difficoltosa a causa della sua origine ibrida e del suo alto livello di ploidia (8n), sembrano essere presenti tre sequenze *cry2-like*. La sequenza-*cry2* di olivo nota finora è lunga 2665 pb, le tre sequenze *cry2-like* identificate in fragola sono lunghe 1845 pb (*contig1*), 1943 pb (*contig2*) e 1725 pb (*contig3*) (Fig. 26). Le percentuali di identità tra le sequenze-*cry2* di olivo e fragola e quelle delle proteine CRY2 di pomodoro e pisello sono riportate

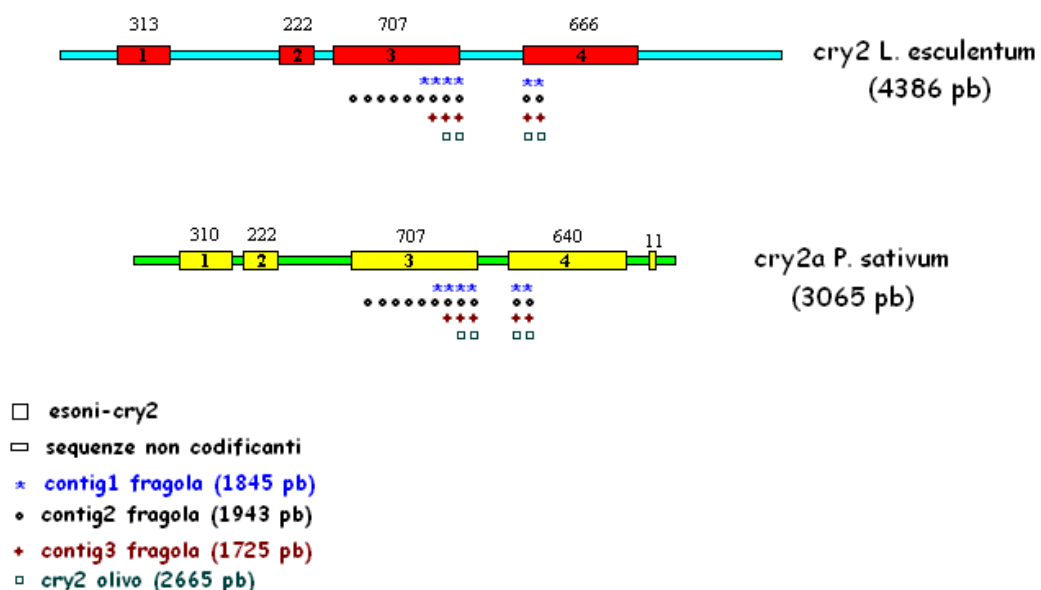


Fig. 26: Rappresentazione grafica del confronto tra le sequenze-*cry2* di fragola ed olivo con le sequenze nucleotidiche dei geni omologhi di *L. esculentum* (AF130426) e *P. sativum* (AY508973). I numeri sopra i box indicano la lunghezza in pb di ciascun esone, i simboli colorati sotto i box indicano le regioni omologhe tra le sequenze-*cry2* confrontate, identificate mediante BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

in Tab. 8.

contig1 F. x ananassa	CRY2 <i>L. esculentum</i>	CRY2A <i>P. sativum</i>	identità
1096 ÷ 1284	267 ÷ 329		68%
1278 ÷ 1364	387 ÷ 415		79%
1760 ÷ 1843	414 ÷ 441		71%
1087 ÷ 1284		263 ÷ 328	60%
1278 ÷ 1364		386 ÷ 414	75%
1760 ÷ 1843		413 ÷ 440	71%
contig2 F. x ananassa	CRY2 <i>L. esculentum</i>	CRY2A <i>P. sativum</i>	identità
468 ÷ 539	97 ÷ 116		66%
547 ÷ 1191	118 ÷ 325		49%
770 ÷ 1462	184 ÷ 415		49%
1858 ÷ 1941	414 ÷ 441		71%
459 ÷ 539		93 ÷ 115	59%
547 ÷ 1191		117 ÷ 324	49%
608 ÷ 1462		136 ÷ 414	42%
1858 ÷ 1941		413 ÷ 440	71%
contig3 F. x ananassa	CRY2 <i>L. esculentum</i>	CRY2A <i>P. sativum</i>	identità
953 ÷ 1048	318 ÷ 349		71%
1039 ÷ 1113	347 ÷ 371		76%
1113 ÷ 1244	372 ÷ 415		81%
1640 ÷ 1723	414 ÷ 441		71%
953 ÷ 1048		317 ÷ 348	65%
1039 ÷ 1113		346 ÷ 370	84%
1113 ÷ 1244		371 ÷ 414	79%
1640 ÷ 1723		413 ÷ 440	71%
cry2 <i>O. europaea</i>	CRY2 <i>L. esculentum</i>	CRY2A <i>P. sativum</i>	identità
3 ÷ 128	374 ÷ 415		83%
1526 ÷ 1627	414 ÷ 447		91%
3 ÷ 158		373 ÷ 429	61%
1526 ÷ 1627		413 ÷ 446	79%

Tab. 8: Percentuali d'identità relative al confronto tra le sequenze-*cry2* di fragola ed olivo con le sequenze aminoacidiche delle proteine CRY2 di *P. sativum* (AAS79665) ed *L. esculentum* (AAF72556), restituite dal programma BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.4 Analisi di *transcript profiling* mediante qRT-PCR

Per saggiare in via preliminare il potenziale coinvolgimento dei geni *cry* nell'espressione del contenuto in polifenoli nei frutti di fragola ed olivo, sono stati realizzati esperimenti di qRT-PCR. I profili trascrizionali dei geni *cry1* e *cry2* sono stati analizzati in entrambe le specie in maniera comparativa tra varietà selezionate per concentrazioni differenziali di alcune classi di polifenoli nel frutto e tra stadi successivi di maturazione.

4.4.1 Olivo

Esperimenti preliminari di qRT-PCR sono stati realizzati in olivo per confrontare i pattern di trascrizione dei geni *cry1* e *cry2* nelle drupe in tre stadi successivi di maturazione del frutto (verde, invaiato, nero) ed appartenenti:

- alle varietà Coratina, Rosciola, Dolce d'Andria e Tendellone, i cui campioni di RNA sono stati gentilmente forniti dall'Istituto di Genetica Agraria del C.N.R. di Perugia (Figg. 13 e 14, Tab. 3);
- alle varietà Cassanese, Nocellara del Belice e Tonda dolce, campionate presso il Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia (Rende, CS) (Fig. 12).

I profili trascrizionali del gene *cry1* sono apparsi piuttosto simili nei frutti delle varietà fornite dal C.N.R. di Perugia (Fig. 27A), che mostrano un decremento più o meno ripido dei livelli di espressione di questo gene durante la maturazione del frutto. Il gene *cry2*, invece, (Fig. 27B), analizzato solo nelle due varietà con concentrazioni fenoliche estreme, mostra *trend* trascrizionali significativamente differenti tra i frutti di Coratina e Tendellone durante la maturazione, con un picco di trascrizione presente solo in Coratina nello stadio nero maturo.

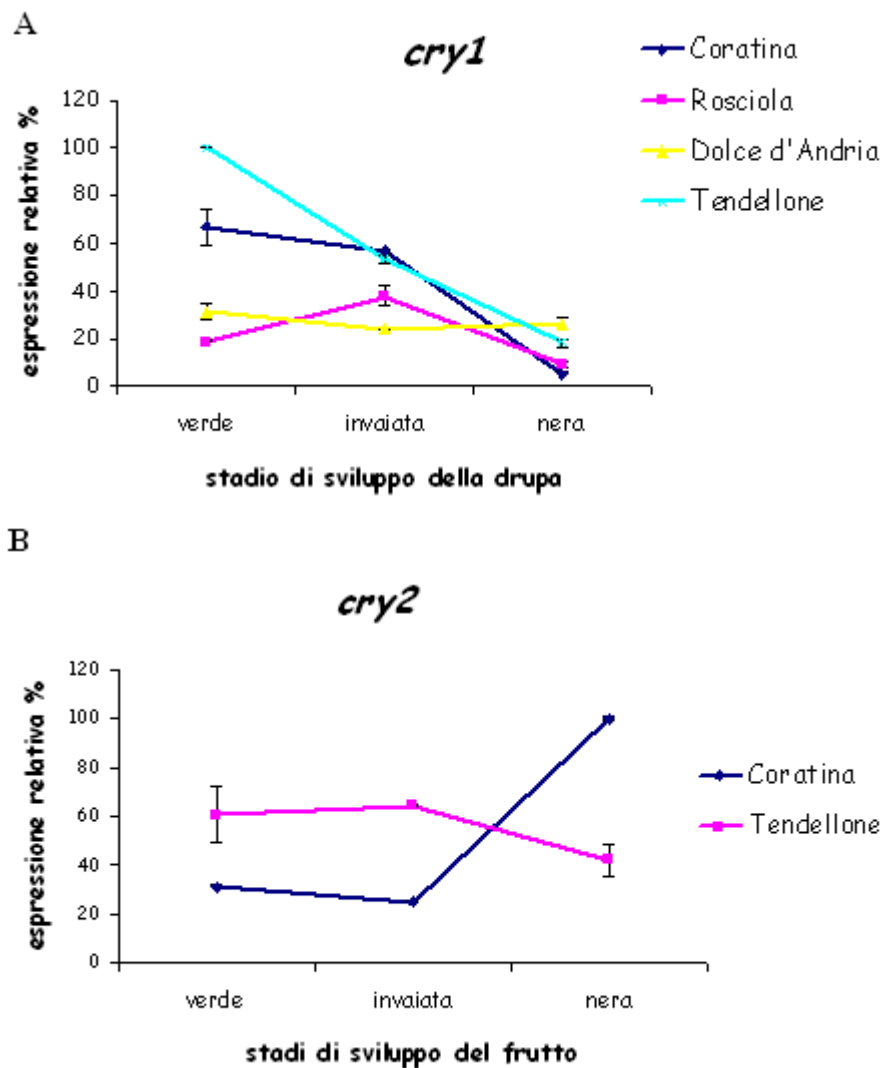


Fig. 27: Analisi di espressione comparativa dei geni *cry1* (in **A**) e *cry2* (in **B**) in varietà di olivo (vedi legende) fornite dall'Istituto di Genetica Agraria del C.N.R. di Perugia, in tre stadi successivi di maturazione del frutto. I livelli di trascrizione riportati nel grafico sono calcolati normalizzati rispetto ai valori di espressione di un gene per l'actina, utilizzato come standard di riferimento.

I risultati degli esperimenti di *transcript profiling* dei geni per i CRY nei frutti delle tre varietà campionate a Rende (Fig. 28A), mostrano profili simili di espressione del gene *cry1*. Differenze marcate si possono, invece, osservare nella trascrizione *cry2*-specificata tra i frutti della cv. Cassanese e quelli delle altre due varietà, in corrispondenza dello stadio nero maturo (Fig. 28B). Ancora una volta, i frutti neri della cv. a più alto contenuto fenolico presentano un picco di espressione del gene *cry2*, assente nei frutti neri di Nocellara del Belice e Tonda Dolce, rispettivamente a medio e basso contenuto fenolico (Fig. 12).

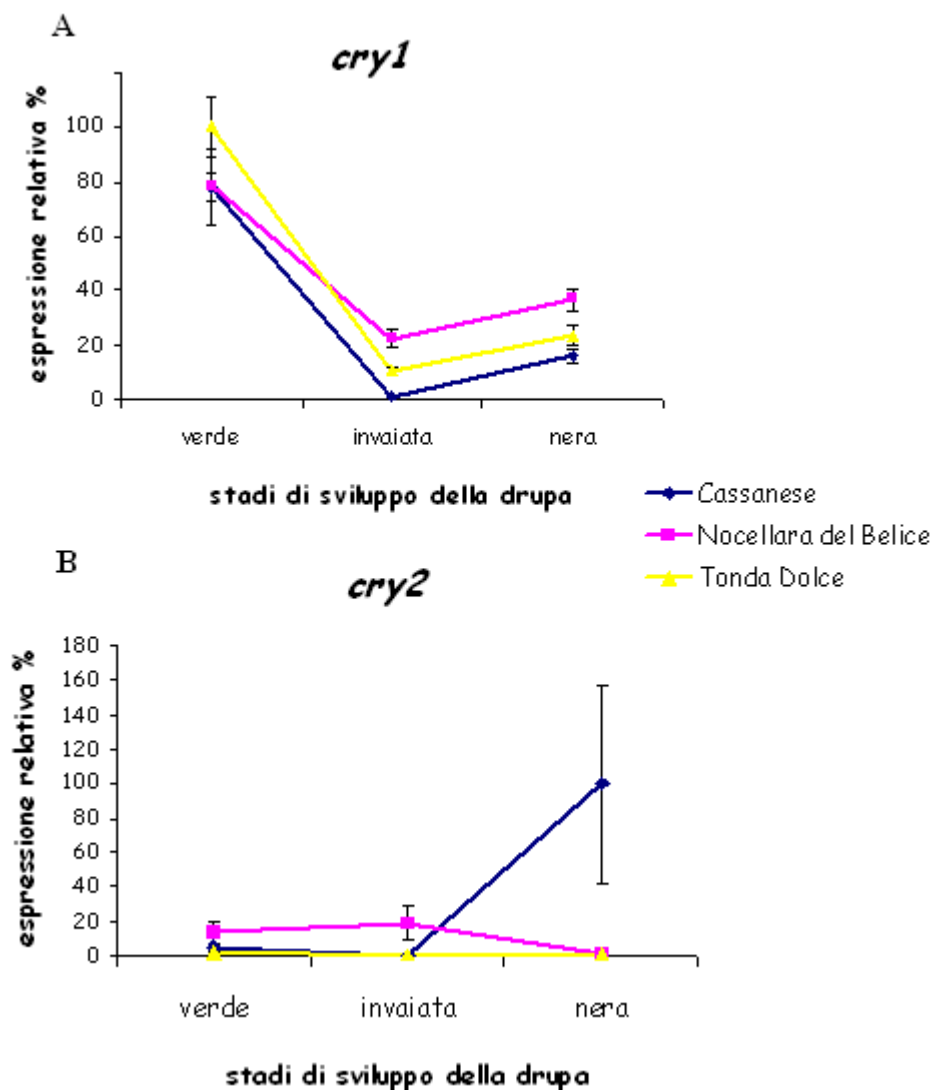


Fig. 28: Analisi di espressione comparativa dei geni *cry1* e *cry2* in tre varietà di olivo (vedi legenda), campionate presso il Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia (Rende, CS), in tre stadi successivi di maturazione del frutto. I livelli di trascrizione riportati nel grafico sono stati normalizzati rispetto ai valori di espressione di un gene per l'actina, utilizzato come standard di riferimento.

I risultati delle analisi preliminari comparative di *transcript profiling* dei geni *cry* in olivo sembrerebbero suggerire che il gene *cry2* sia quello più verosimilmente capace di influenzare il contenuto di polifenoli nei frutti di olivo.

4.4.2 Fragola

Per gli esperimenti di qRT-PCR in fragola, le sequenze dei primer specifici per i geni *cry1* e *cry2* di fragola sono state scelte, rispettivamente, nella regione terminale al -3' dell'esone 4 del gene *cry1* di fragola (Fig. 25) ed all'interno di una EST di

Fragaria vesca, registrata nelle banche dati e corrispondente ad una regione molto conservata dei geni *cry2* di piante. In tutti i genotipi confrontati, i livelli di trascrizione del gene *cry2* risultano significativamente più elevati di quelli di *cry1*.

Il pattern di trascrizione del gene *cry1* appare piuttosto simile in tutte e tre le varietà studiate (Fig. 29): i livelli di espressione del gene tendono ad aumentare nel corso della maturazione e sono generalmente più elevati nella cv. Camarosa, che produce i frutti più ricchi di antocianine (Fig. 16). La differenza nella quantità di trascritti-*cry1* tra la cv. Camarosa e le altre due varietà si accentua nell'ultimo stadio (R) di maturazione, in cui le antocianine raggiungono valori massimi di concentrazione. Nei frutti di Camarosa e Onda, caratterizzati da concentrazioni estreme di antocianine (Fig. 16), si evidenziano due picchi di espressione del gene *cry1*, il primo nello stadio bianco (W) ed il secondo nello stadio rosso (R). Il pattern *cry1*-specifico relativo ai frutti della cv. 99.163.14, che presentano un contenuto relativamente più elevato di flavan-3-oli (Fig. 16), mostra, invece, un solo picco di espressione nello stadio *turning* (T) (Fig. 29).

I profili trascrizionali del gene *cry1* sono stati analizzati alla luce dei risultati ottenuti in recenti studi di espressione di alcuni geni strutturali della *pathway* dei flavonoidi in fragola (cv. Queen Elisa), caratterizzati nei nostri laboratori (Almeida et al., 2007), e di altri dati di letteratura, relativi alle variazioni della composizione in flavonoidi nel frutto di fragola durante la maturazione. Questi dati dimostrano che la biosintesi dei flavonoidi nel frutto avviene in due fasi: la prima fase, produce un accumulo di catechine, epicatechine e proantocianidine all'interno dei frutti verdi giovani; la seconda fase, invece, è caratterizzata da un incremento di flavonoli ed antocianine negli stadi T ed R, rispettivamente. In corrispondenza dello stadio T, peraltro, l'accumulo di flavonoli è correlato ad un picco di trascrizione del gene FLS (flavonol sintasi, Fig. 4), registrato nei frutti allo stadio T della cv. Queen Elisa nello studio di Almeida et al. (2007). Il picco di espressione più alto del gene *cry1* nei frutti della cv. 99.163.14 è raggiunto allo stadio T, lo stesso stadio di maturazione in cui la

letteratura riporta un accumulo di flavonoli (Halbwirth et al., 2006) ed un picco di espressione del gene FLS (Almeida et al., 2007).

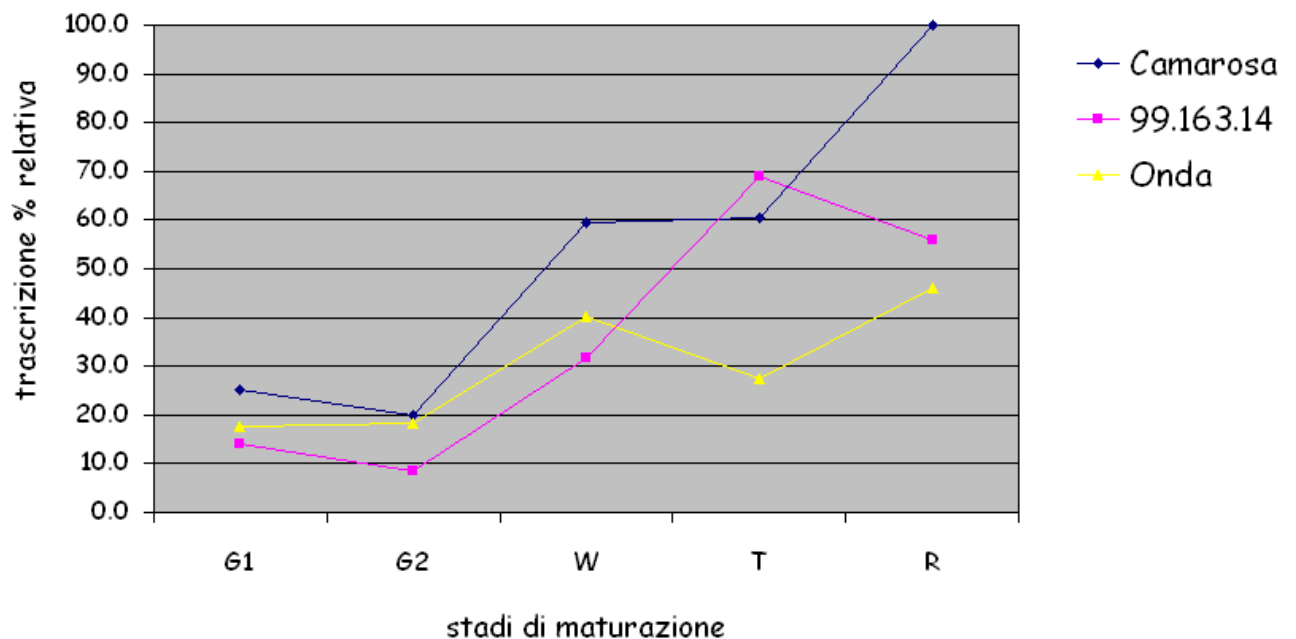


Fig. 29: Analisi di espressione comparativa del gene *cry1* in tre varietà di fragola (vedi legenda) in cinque stadi successivi di maturazione del frutto (G1-R). I livelli di trascrizione riportati nel grafico sono calcolati come medie percentuali tra due repliche sperimentali e normalizzate rispetto ai valori di espressione di un gene per l'actina, utilizzato come standard di riferimento.

Riassumendo, livelli di trascritti *cry1*-specifici significativamente più elevati nei frutti della cv. Camarosa, che accumula quantità più elevate di antocianine nel frutto, e relativamente inferiori in tutti gli stadi di maturazione nei frutti della cv. Onda, che ha il più basso contenuto in tutte le classi di flavonoidi, suggerirebbero in via preliminare il potenziale coinvolgimento del gene *cry1* nell'accumulo di questi composti nel frutto di fragola (Fig. 29).

I pattern di trascrizione dei geni *cry2* nei frutti delle tre varietà sono, invece, poco confrontabili (Fig. 30). Variazioni sensibilmente differenti nei livelli di trascritti *cry2*-specifici durante la maturazione del frutto risultano di difficile lettura alla luce delle differenze nei profili metabolici associati alle varie classi di flavonoidi, tra le varietà selezionate (Fig. 30). *Trend* trascrizionali così discordanti suggerirebbero che *cry2*, a differenza di *cry1*, non sia propriamente coinvolto nell'espressione del contenuto di flavonoidi nel frutto di fragola.

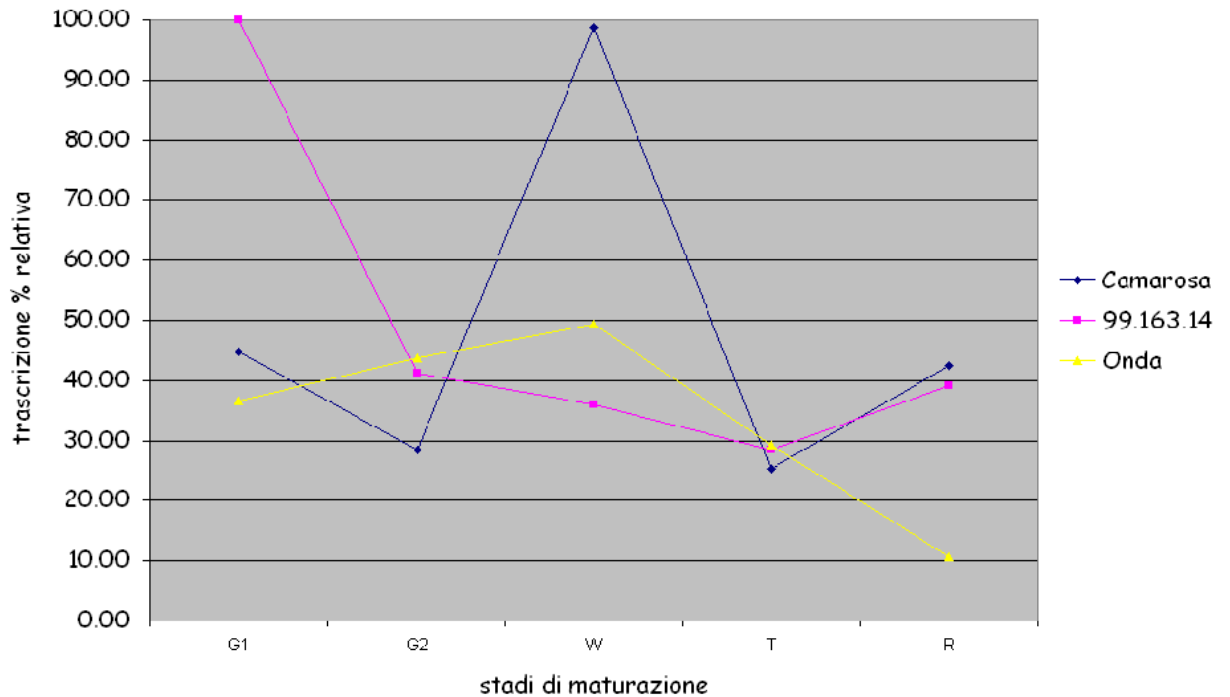


Fig. 30: Analisi di espressione comparativa del gene *cry2* in tre varietà di fragola (vedi legenda) in cinque stadi successivi di maturazione del frutto (G1-R). I livelli di trascrizione riportati nel grafico sono calcolati come medie percentuali tra due repliche sperimentali e normalizzate rispetto ai valori di espressione di un gene per l'actina, utilizzato come standard di riferimento.

Possiamo, pertanto, concludere che mentre in olivo il gene *cry2* sembrerebbe il candidato più probabilmente coinvolto nell'accumulo dei polifenoli più rappresentati nel frutto, in fragola, al contrario, il gene *cry1* ha mostrato una correlazione più verosimile con i pattern di accumulo dei flavonoidi nei frutti delle varietà confrontate.

5. Conclusioni

Il lavoro sperimentale svolto durante il dottorato è stato focalizzato, principalmente, sull'allestimento e l'analisi del primo database di EST di olivo (ancora non pubblicato), mediante la tecnologia del *pyrosequencing* 454. Questo database, che include circa 260.000 sequenze geniche espresse in frutto, incrementa considerevolmente il numero esiguo di dati di sequenza della specie *Olea* finora disponibili. Si tratta di una piattaforma originale, dal momento che comprende sequenze espresse:

1. all'inizio ed alla fine della fase di crescita in cui il frutto acquisisce caratteristiche morfo-fisiologiche (peso, forma, contenuto in olio, accumulo di polifenoli antiossidanti) importanti per la qualità del frutto e dell'olio d'oliva;
2. in due varietà con caratteristiche qualitative differenti, Coratina, che presenta concentrazioni elevate di oleuropeina ed altri oleosidi nel frutto ed una forte resistenza contro i patogeni, e Tendellone, una variante naturale con concentrazioni estremamente basse di oleuropeina ed altri polifenoli nel frutto.

Analisi comparative di *transcript profiling* tra i due stadi di sviluppo del frutto e tra le due varietà studiate hanno permesso di identificare geni importanti per la fisiologia dello sviluppo del frutto, in accordo con i dati riportati in letteratura. Una regolazione stadio-specifica e/o varietà-specifica è stata, inoltre, osservata nell'espressione di geni associati alla fotosintesi, alla resistenza a stress biotici ed abiotici, alla biosintesi di acidi grassi e metaboliti secondari, come le vitamine ed alcune classi di terpenoidi e flavonoidi, che influenzano positivamente le proprietà nutrizionali del frutto e dell'olio di oliva. La cv. Coratina, qualitativamente superiore, ha mostrato un corredo trascrizionale significativamente più ricco di trascritti varietà-specifici, coinvolti nella biosintesi e regolazione ormonale, nella sintesi di alcaloidi e terpeni antitumorali, nella resistenza alle malattie e ad altri fattori di stress,

nei riarrangiamenti strutturali della parete cellulare caratteristici dei processi di crescita del frutto, nell'accumulo di flavonoidi all'interno del mesocarpo.

Informazioni scarse sulla regolazione e la biosintesi dei secoiridoidi oleosidi, presenti solo in *Olea* ed in altre Oleaceae, limitano fortemente l'analisi dei meccanismi molecolari responsabili dell'accumulo differenziale di questi polifenoli antiossidanti nei frutti delle due varietà studiate.

Alla luce di studi recenti che attestano l'influenza dei geni per i fotorecettori CRY nell'accumulo di pigmenti antiossidanti nei frutti, nel corso del dottorato, ai geni *cry* è stato attribuito il ruolo di potenziali "candidati" coinvolti nell'espressione del contenuto di polifenoli nei frutti di olivo e fragola. I geni *cry1* e *cry2* sono stati, pertanto, identificati e parzialmente caratterizzati in entrambe le specie, mediante esperimenti di clonaggio e sequenziamento di prodotti di PCR gene-specifici.

Allo scopo di saggiare, in via preliminare, le loro funzioni in qualità di geni "candidati", i geni *cry* sono stati sottoposti ad analisi di espressione comparativa, mediante esperimenti di qRT-PCR, durante la maturazione, nei frutti di olivo e fragola. I frutti analizzati sono stati campionati da varietà selezionate sulla base di profili metabolici differenziali associati alle principali classi di polifenoli antiossidanti nelle fragole (flavonoidi) e nelle olive (secoiridoidi glicosidi). I risultati ottenuti suggerirebbero che il gene *cry1* sia il "candidato" più verosimile nella regolazione dell'accumulo di flavonoidi nel frutto di fragola e *cry2*, invece, il gene più probabilmente coinvolto nell'espressione di polifenoli nella drupa di olivo.

Bibliografia

- **Agaton C**, Unneberg P, Sievertzon M, Holmberg A, Ehn M, Larsson M, Odeberg J, Uhlen M, Lundeberg J (2002). Gene expression analysis by signature pyrosequencing. *Gene*, 289: 31-39.
- **Ahmad M**, Cashmore AR (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366: 162-166.
- **Ahmadian A**, Ehn M, Hober S (2006). Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chem Acta*, 363: 83-94.
- **Almeida et al.** (2007) *Arch Biochem Biophys*, in press.
- **Altschul SF**, Madden TS, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res*, 25: 3389-3402.
- **Bicas JL**, Cavalcante Barros FF, Wagner R, Godoy HT, Pastore GM (2008). Optimization of *R*-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene. *J Industrial Microbiol Biotechnol*
- **Boss PK**, Davies C, Robinson SP (1996). Analysis and the expression of anthocyanins pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 11:1059-1066.
- **Botia JM**, Ortuno A, Benavente-Garcia O, Baidez AG, Frias J, Marcos D, Del Rio Ja (2001). Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: their influence on olive oil quality. *J Agric Food Chem*, 49:355-358.
- **Bouaziz M**, Grayer RJ, Simmonds MSJ, Damak M, Sayadi S (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *J Agric Food Chem*, 53:236-241.
- **Chatterje M**, Sharma P, Khurana P (2006). Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotil/stem growth and anthocianin accumulation.
- **Conde C**, Delrot S, Geros H (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J Plant Physiol*. Article in press.
- **D'Amico E**, Perrotta G (2005). Genomics of berry fruits antioxidant components. *Biofactors*, 23: 179-187, IOS Press.
- **Debeaujon I**, Peeters AJM, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2001). The TRANSPARENT TESTA 12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary

transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*, 13: 853-871.

- **Della Porta** SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol Biol*, 1: 19-21.
- **Dubey** VS, Bhalla R, Luthra R (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci*, 28 (5): 637-646.
- **Eisenreich** W, Rohdich F, Bacher A (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci*, 6(2):1360-1385.
- **Facella** P, Lopez L, Chiappetta A, Bitonti MB, Giuliano G, Perrotta G (2006). CRY-DASH gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Letters*, 580: 4618-4624.
- **Frohman** MA, Dush MK, Martin GR (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 8998-9002.
- **García** JM, Sellar S, Pérez-Camino C (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *J Agric Food Chem*, 44: 3516-3520.
- **Giliberto** L, Perrotta G, Pallara P, Weller JL, Fraser PD, Bramley PM, Fiore A, Tavazza M, Giuliano G (2005). Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol* 137: 199-208.
- **Guo** H, Yang H, Mockler T, Lin C (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, 279: 1360-1363.
- **Halbwrith** H, Puhl I, Haas U, Jekiz K, Treutter D, Stich K (2006). Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *J Agric Food Chem*, 54:1479-1485.
- **Halvorsen** BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod H, Andersen LF, Moskaug O, Jacobs DRjr, Blomhoff R (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*, 132: 461-471.
- **Hoffman** PD, Batschauer A, Hays JB (1996). PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and photolyases. *Gen Genet*, 253: 259-265.

- **Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M (2001).** Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 14: 373-386.
- **Imaizumi T, Kanegae T, Wada M (2000).** Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell*, 12: 81-96.
- **Jaakola L, Määttä K, Pirtillä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A (2002).** Expression of genes involved in anthocyanin, proanthocyanin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol*, 130:729-739.
- **Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A (2004).** Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218:721-728.
- **Jensen SR, Franzyk H, Wallander E (2002).** Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochem*, 60: 213-231.
- **Kanegae T, Wada M (1998).** Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Mol Gen Genet*, 259: 345-353.
- **Keys A (1995).** Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin*, 61: 1321S-1323S.
- **Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003).** An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J*, 35: 95-103.
- **Lepiniec L, Caboche M, Baudry A (2006).** TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 46: 768-779.
- **Lin C (2002).** Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, 14 (Suppl.): 207-225.
- **Lin C, Ahmad M, Chan J, Cashmore AR (1996).** CRY2, a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiol*, 110: 1047.
- **Lin C, Shalitin D (2003).** Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 469-496.

- **Lin C**, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by blue light receptor cryptochrome 2. *Procl Natl Acad Sci USA*, 95: 2686-2690.
- **Margulies M**, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman NS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437 (7057): 376-380.
- **Marinova K**, Pourcel L, Weder B, Schwarz M, Barron D, Routaboul JM, Debeaujon I, Klein M (2007). The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺ -antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell*, 19: 2023-2038.
- **Matsumoto N**, Hirano T, Iwasaki T, Yamamoto N (2003). Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. *Plant Physiol*, 133: 1494-1503.
- **Moteki H**, Hibasami H, Yamada Y, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T (2002). Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncol Rep*, 9(4): 757-760.
- **Nicholas KB**, Nicholas HB, Deerfield DW II (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet.news*, Vol 12, n.2.
- **Owen RW**, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Tox*, 41: 703-717.
- **Pearson WR**, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Procl Acad Sci USA*, 85: 2444-2448.
- **Perrotta G**, Ninu L, Flamma F, Weller JL, Kendrick RE, Nebuloso E, Giuliano G (2000). Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2. *Plant Mol Biol*, 42: 765-773.
- **Perrotta G**, Yahoubyan G, Nebuloso E, Renzi L, Giuliano G (2001). Tomato and barley contains duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ*, 24: 991-997.

- **Pietta P (2000)**. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63: 1035-1042.
- **Ronaghi M (2006)**. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. www.genome.org
- **Ryan D, Robards K, Lavee S (1999)**. Changes in phenolic content of olive during maturation. *I J Food Sci Technol*, 34: 265-274.
- **Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M**. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit (2005). *Nutrition*, 21: 207-213.
- **Schijlen EGWM, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG (2004)**. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochem*, 65: 2631-2648.
- **Schwab W, Raab T (2004)**. Developmental changes during strawberry fruit ripening and physico-chemical changes during postharvest storage. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*, Vol. 3, "Quality Handling and Evaluation", pp. 341–369. R. Dris and S. M. Jain (eds.).
- **Servili M, Montedoro G (2002)**. Contribution of phenolic compounds to virgin oil quantity. *Eur J Lipid Technol*, 104: 602-613.
- **Siebert PD, Chenchilk A, Kellog DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995)**. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucl Acids Res*, 23: 1087-1088.
- **Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers H (2000)**. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*, 80: 1013-1023.
- **Stekel DJ, Git Y, Falciani F (2000)**. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Genome Res*, 10(12): 2055-2061.
- **Townsend BJ, Poole A, Blake CJ, Llewellyn DJ (2005)**. Antisense Suppression of a (*I*)-*d*-Cadinene Synthase Gene in Cotton Prevents the Induction of This Defense Response Gene during Bacterial Blight Infection But Not Its Constitutive Expression. *Plant Physiol*, 138: 516-528.
- **Tuck KL, Hayball PJ (2002)**. Major phenolics compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*, 13: 636-644.
- **Vandenbussche F, Habricot Y, Condiff AS, Maldiney R, Van Der Straeten D, Ahmad M (2007)**. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*
- **Wade HK, Bibikova TN, Valentine WJ, Jenkins GI (2001)**. Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant J*, 25(6):675-685.

- **Wang** H, Cao G, Prior RL (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem*, 44:701-705.
- **Zhang** Y-C, Gong S-F, Li Q-H, Sang Y, Yang H-Q (2006). Functional and signaling analysis of rice CRYPTOCHROME 1. *Plant J*, 46:971-983.


**Relazione finale del Collegio dei docenti
sull'attività svolta dal Dott.ssa Laura TORCHIA**

Nel corso del dottorato la dott.ssa Laura Torchia ha condotto l'attività di ricerca sul tema prescelto Relativo alla caratterizzazione molecolare di geni coinvolti nell'espressione di caratteri qualitativi nel frutto.

La dottoranda è stata coinvolta nella determinazione di una banca dati di geni espressi nella drupa di olivo in maturazione. Questa attività è stata progettata ed eseguita con tecnologie innovative ed ha consentito di determinare la sequenza di oltre 200.000 geni espressi nella drupa. L'analisi dei dati ha fornito nuove informazioni sulle dinamiche molecolari che intervengono nello sviluppo dell'oliva e ha consentito di confrontare l'abbondanza di trascritti fra stadi di sviluppo e fra genotipi differenziati per l'espressione di caratteri qualitativi. Dati ulteriori sono poi stati ottenuti da analisi mirate di espressione su geni candidati su genotipi ad accumulo differenziato di composti fenolici. La termine del percorso formativo la dott.ssa Torchia ha acquisito una sufficiente autonomia e capacità propositiva.

La dott.ssa Torchia ha svolto il lavoro sperimentale presso l'ENEA CR Trisaia e alcuni risultati della sua ricerca sono attualmente utilizzati per la preparazione di un manoscritto da sottoporre ad una rivista scientifica internazionale.

Sulla base della relazione orale della Dottoranda e del parere fornito dal tutor, Dott. Gaetano Perrotta, il Collegio dei docenti esprime pieno apprezzamento per i risultati conseguiti nel triennio dalla Dott.ssa Torchia.

A nome del Collegio dei Docenti
Il coordinatore del Corso di Dottorato

Prof. Aldo Musacchio

