



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO: BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
CICLO XXIII**

**EVOLUZIONE DEI FRUTTI: I
PRINCIPALI MECCANISMI
MOLECOLARI ALLA BASE DELLO
SVILUPPO DEI FRUTTI CARNOSI SONO
APPARSI GIA' NELLE GIMNOSPERME**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Dottorando: Alessandro Lovisetto

Ai miei genitori

Ai miei amici:

Nicola, Valeria, Alice, Anna.

INDICE

Abstract	1
Riassunto	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 I frutti e il loro ruolo nella dispersione dei semi	5
1.2 Maturazione dei frutti carnosì	8
1.3 I geni MADS-box	15
1.4 Le Gimnosperme	21
1.5 I geni MADS-box nelle Gimnosperme	26
2 SCOPO DEL LAVORO	31
3 MATERIALI E METODI	33
3.1 Soluzioni comuni	33
3.2 Materiale vegetale	34
3.3 Estrazioni di acidi nucleici	35
3.3.1 Estrazione di RNA totale	35
3.3.2 Estrazione di DNA genomico	36
3.4 Determinazione della concentrazione degli acidi nucleici	36
3.5 Purificazione dell'RNA dal DNA plasmidico	37
3.6 Sintesi del cDNA: 3' RACE	38
3.7 Sintesi del cDNA: 5' RACE	39
3.8 Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)	41
3.9 Purificazione dei prodotti di PCR	42

3.10 Purificazione da banda	42
3.11 Reazione di ligazione	43
3.12 Trasformazione di <i>Escherichia coli</i> mediante elettroporazione	44
3.13 Amplificazioni dei cloni batterici	44
3.14 Preparazione di DNA plasmidico	45
3.15 Sequenziamento	47
3.16 Progettazione di oligonucleotidi	47
3.17 Trattamenti con etilene	47
3.18 Real time PCR	48
3.19 Analisi filogenetica	51
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	53
4.1 Studio dello sviluppo	53
4.1.1 Geni di tipo <i>AGL6</i>	53
4.1.2 Analisi dei geni appartenenti al gruppo dei <i>TM8</i>	58
4.2 Sindrome di maturazione	62
4.2.1 Rammollimento	64
4.2.2 Cambiamento di colore	67
4.2.3 Sintesi e percezione di etilene	69
5 CONCLUSIONI	75
6 ALLEGATI	79
7 BIBLIOGRAFIA	101

ABSTRACT

The fruit is a typical Angiosperm structure that derives from an ovary after fertilisation. It has greatly contributed to the evolutionary success of Angiosperms because of the fundamental role played in the dispersal of seeds. Gymnosperms produce seeds like Angiosperms but, unlike the latter, they do not make flowers, therefore they cannot develop fruit proper. However, in all living Gymnosperm taxa (*Cycadales*, *Ginkgoales*, *Coniferales* and *Gnetales*) species can be found that produce seeds surrounded by fleshy structures. The latter would not be a real fruit because they are not originated from ovaries which are present only in flowers. However, from a functional point of view these structures behave like real fruits because they facilitate the dispersal of seeds.

The aim of this work is to study some of the molecular mechanisms involved in the development and ripening of fleshy structures in two Gymnosperms: *Ginkgo biloba* and *Taxus baccata*. They represent two Gymnosperms whose seeds are surrounded by fleshy structures that have different origins. In ginkgo it is the external integument of the seed that grows and becomes fleshy, while in yew the fleshy aril develops *de novo* from the peduncle at the base of the ovule.

Regarding development, MADS-box genes belonging to different groups (i.e. *AGL6* and *TM8*) were studied. The expression pattern of these genes was determined for both species in several tissues, with particular attention for the pulp at different stages of development. Results indicate a possible role for the above genes during the formation and ripening of both ginkgo and yew "fruits". Interestingly, a previous study had demonstrated that another MADS-box gene (i.e. *AGAMOUS*) was involved in fruit development and ripening in the same species (Lovisetto, 2007). These results suggest that similar genes have been recruited for the development of fleshy fruits in Angiosperms and Gymnosperms.

In order to investigate the molecular aspects of the ripening syndrome, several genes involved in the softening process, in the change of color, in the synthesis and perception of ethylene were studied both in ginkgo and yew. Results indicate a strong similarity between aril and Angiosperm fruits as regards the ripening process even though ethylene does not appear to be produced by a system 2 pathway as occurs in the truly climacteric fruits.

Based on the function performed and the molecular characteristics studied in this work, the fleshy structures surrounding the Gymnosperm seeds can be defined fruits. Thus, the “fruit” function seems to have developed in parallel with the seed and to have pre-dated the appearance of the flower.

RIASSUNTO

Il frutto, inteso come struttura derivata dall'ovario in seguito ad un evento di fecondazione, è esclusivo delle Angiosperme. Esso ha contribuito enormemente al successo evolutivo di queste piante dato il ruolo fondamentale che svolge nel processo di dispersione dei semi. Tuttavia, anche le Gimnosperme producono i semi, anche se a differenza delle Angiosperme non fanno fiori. In tutti i principali taxa di Gimnosperme viventi (*Cycadales*, *Ginkgoales*, *Coniferales* e *Gnetales*) sono presenti specie che producono semi circondati da strutture carnose che non sarebbero veri frutti perché non sono originate da ovari. Però, da un punto di vista funzionale, queste strutture sono da considerarsi come dei frutti poiché, come nel caso dei frutti delle Angiosperme, anch'esse facilitano la dispersione dei semi.

In questo lavoro sono stati studiati alcuni meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella maturazione dei "frutti" di due Gimnosperme: *Ginkgo biloba* e *Taxus baccata*. Queste due specie sono state scelte perché rappresentano due modelli sperimentali diversi. Nel caso del ginkgo è il tegumento esterno del seme che diventa carnoso e si trasforma in frutto, mentre nel caso del tasso la struttura carnosa è costituita da un arillo che si forma *ex novo* dalla base dell'ovulo.

Per quanto riguarda lo sviluppo, in entrambe le specie, sono stati studiati geni di tipo MADS-box appartenenti a due gruppi diversi: *AGL6* e *TM8*. Il pattern di espressione di questi geni è stato analizzato per entrambe le specie con particolare attenzione per la polpa a diverso stadio di sviluppo. Da queste analisi è emerso come questi geni siano espressi durante la formazione e la maturazione sia dell'arillo di tasso che della polpa di ginkgo. Inoltre, visto che anche il gene *AGAMOUS* partecipa allo sviluppo e alla maturazione sia del "frutto" di tasso che del "frutto" di ginkgo (Lovisetto, 2007), si può concludere che geni regolativi simili a quelli espressi nei frutti veri delle Angiosperme sono implicati anche nello sviluppo delle strutture carnose che circondano i semi di tasso e di ginkgo. Poiché nulla era noto a livello molecolare riguardo alla sindrome di maturazione dell'arillo di tasso e della polpa di ginkgo, sono stati isolati e analizzati anche alcuni geni che nelle Angiosperme codificano per enzimi coinvolti nei processi di rammollimento, cambiamento di colore e sintesi e percezione di etilene. I risultati hanno mostrato come nella maturazione dell'arillo di tasso siano coinvolti lo stesso tipo di geni che operano nella maturazione dei

veri frutti delle Angiosperme, anche se nel caso dell'etilene ci sono delle differenze rispetto a quanto avviene nei frutti climaterici. Invece, nel caso del ginkgo sembra che la polpa vada incontro a un processo di senescenza in generale più che a un processo di maturazione vera e propria.

In conclusione, i risultati di questo lavoro suggeriscono che nel corso dell'evoluzione la funzione "frutto" si sia evoluta assieme al seme e abbia quindi preceduto la comparsa dei fiori.

1.INTRODUZIONE

1.1 I FRUTTI E IL LORO RUOLO NELLA DISPERSIONE DEI SEMI

Le piante sono organismi sessili e come tali compiono il loro intero ciclo vitale nel luogo in cui germinano e si sviluppano. In particolare per ottimizzare il loro ciclo riproduttivo, le piante vascolari hanno evoluto una nuova e fondamentale struttura: il seme. Sono note piante fossili con semi che formano un gruppo molto composito e vengono generalmente chiamate Pteridospermafite. Le piante appartenenti a questo gruppo sono ormai tutte estinte e attualmente le piante che producono semi sono le Spermatofite che comprendono Gimnosperme e Angiosperme. Il seme si forma come conseguenza di un atto riproduttivo per gamia e contiene un giovane individuo che, dopo aver raggiunto un determinato grado di accrescimento, diviene quiescente e capace di comportarsi *in toto* come un apparato di resistenza. Una volta pronto, il seme si stacca dalla pianta che l'ha prodotto accompagnato da strutture atte a proteggerlo e a nutrirlo al suo risveglio. Per non rendere vano questo notevole sforzo generativo i semi si devono poter disperdere il più lontano possibile dalla pianta che li ha originati. Se così non fosse, essi cadrebbero ai piedi di quest'ultima e dovrebbero subire la competizione con essa per la luce e per le risorse disponibili nel terreno. La dispersione dei semi diviene ancor più essenziale considerando il fenomeno dell'allelopatia, ovvero l'inibizione della germinazione e/o della crescita di altre piante attraverso il rilascio nel terreno da parte delle radici di sostanze potenzialmente dannose. Tipici esempi di questi composti sono l'acido caffeico e l'acido ferulico (Taiz e Zeiger, 2009).

Per soddisfare questa esigenza di disperdere i semi, le Spermatofite hanno sviluppato diverse strategie: in particolare le Angiosperme hanno adottato come soluzione la produzione dei frutti il cui scopo, infatti, non è solo quello di proteggere i semi durante la loro maturazione, ma soprattutto quello di assicurarne la diffusione a maturazione avvenuta. Per questa ragione, nel corso dell'evoluzione, sono comparsi diversi sistemi in grado di favorire la disseminazione. Uno molto comune è l'anemocoria che sfrutta l'opera del vento,

Introduzione

il quale è in grado di trasportare semi di piccole dimensioni polveriformi, come nel caso delle *Orchidaceae* oppure di far restare in aria per un certo tempo i semi dotati di organi di volo come peli o espansioni alari. Si parla di idrocoria, invece, quando l'agente in grado di disperdere i semi è costituito dall'acqua, la quale può trasportare anche semi di grosse dimensioni per lunghe distanze, come quelli del *Cocos nucifera* che possono così viaggiare negli oceani da un'isola ad un'altra. Numerose specie vegetali si affidano invece agli animali per disperdere i propri semi: in questa circostanza si parla di zoocoria; essa può essere effettuata passivamente o attivamente. Nel primo caso, detto epizoocoria, i disseminuli rimangono semplicemente adesi al corpo dell'animale e i dispositivi che la facilitano sono setole, spine oppure aculei uncinati come, ad esempio, nel caso di *Arctium lappa* in cui è l'intero capolino a essere disperso. Nel secondo caso (figura 1) è coinvolto l'intero frutto che, essendo carnoso, vistoso, profumato e ricco di sostanze nutrienti, risulta attraente ed appetibile per gli animali frugivori che, cibandosene, rilasciano poi i semi nell'ambiente attraverso le proprie defezioni. In alcuni casi questo processo si è così affermato che alcuni semi per germinare devono necessariamente attraversare l'apparato digerente degli animali.



Figura 1: Esempi di zoocoria attiva. (<http://static.desktopnexus.com/thumbnails/195019-bigthumbnail.jpg>).

Da un punto di vista botanico, il frutto deriva dall'accrescimento e dalla trasformazione dell'ovario, e quindi solo le Angiosperme sono in grado di produrlo poiché sono le uniche piante a possedere il fiore e quindi l'ovario (Figura 2A). La sua formazione inizia al momento della fecondazione quando il tubetto pollinico, oltre ai due nuclei spermatici, rilascia anche dei segnali ormonali che

Introduzione

causano un rapido e transiente aumento di auxina a livello della parete dell'ovario (Spena e Rotino, 2001). Quest'ultimo dà il via a una serie di moltiplicazioni cellulari che portano a una rapida crescita dell'ovario stesso e alla sua successiva trasformazione in frutto.

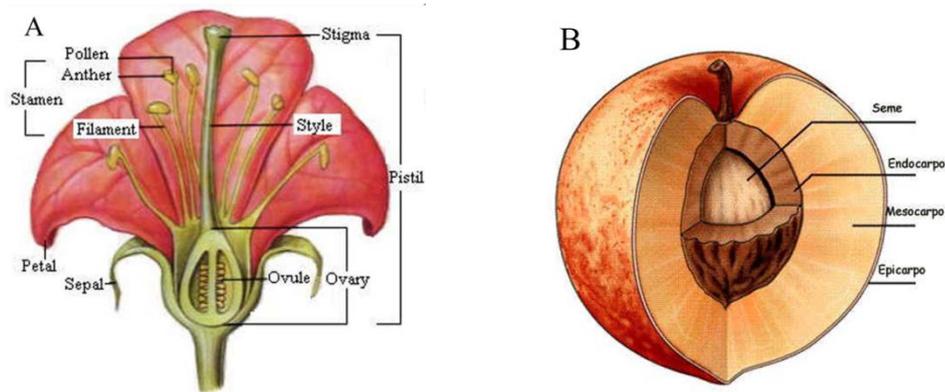


Figura 2: (A) Rappresentazione schematica di un fiore. (B) Rappresentazione schematica di un frutto carnoso di tipo drupa (<http://www.albanesi.it/Alimentazione/cibi/pesca.htm>).

La classificazione dei frutti si basa su diverse caratteristiche, tra cui quella più evidente è data dal contenuto in acqua del pericarpo, che può essere carnoso oppure secco. In particolare, i frutti carnosi, che sono quelli di cui mi sono occupato e a cui farò riferimento in questo lavoro, sono caratterizzati da un parenchima ricco di acqua e si distinguono fondamentalmente in bacche (es. pomodoro) dotate di endocarpo carnoso e in drupe (es. pesca) dotate di un endocarpo lignificato (Figura 2B). Poiché il carpello da cui si forma l'ovario è considerato una foglia modificata racchiusa su sé stessa, nel frutto carnoso si possono distinguere tre strati che corrispondono rispettivamente ad epidermide superiore (epicarpo), mesofillo (mesocarpo) ed epidermide inferiore (endocarpo). Nel caso in cui altre parti del fiore siano coinvolte nella formazione del frutto, si parla di frutti accessori o più semplicemente di falsi frutti. Per esempio nel frutto tipo "pomo" (mele, pere) la parte carnosa e commestibile si origina dal ricettacolo florale che si accresce e si fa succulento mentre il vero frutto, dove sono contenuti i semi, è il cosiddetto torsolo.

1.2 MATURAZIONE DEI FRUTTI CARNOSI

I processi che portano alla maturazione di un frutto carnoso sono dovuti a una serie di cambiamenti biochimici e fisiologici che avvengono negli stadi terminali del suo sviluppo e lo rendono così adatto alla dispersione dei semi nell'ambiente. Il programma specifico di maturazione varia tra le specie ma in linea generale i cambiamenti rimangono simili e comprendono:

- Modificazioni del colore che portano all'accumulo di particolari carotenoidi e/o di flavonoidi e antociani;
- Perdita di consistenza (rammollimento) della polpa;
- Modificazione del contenuto di zuccheri, acidi organici e molecole volatili che influenzano la qualità nutrizionale, il profumo e l'aroma;
- Un aumento della suscettibilità ai patogeni opportunisti come conseguenza del rammollimento (Giovannoni, 2004).

Tra le numerose modificazioni che coinvolgono un frutto che sta maturando, sicuramente il cambiamento di colore è quello che colpisce e attira maggiormente. I frutti immaturi, che sono verdi e si confondono con il fogliame, acquisiscono colori più o meno vistosi che li fanno risaltare sullo sfondo verde delle foglie, diventando così particolarmente visibili agli animali frugivori che se ne possono cibare. Quindi, dal punto di vista macroscopico la variazione di colore serve a segnalare che la maturazione è avvenuta. Questo fenomeno è stato studiato soprattutto in pomodoro, dove il carotenoide licopene rappresenta il principale pigmento del frutto maturo. La tipica transizione di colore da verde a rosso è dovuta alla trasformazione dei cloroplasti del pericarpo in cromoplasti; infatti, è proprio in questi organelli che, in concomitanza con la degradazione della clorofilla e delle membrane fotosintetiche, si accumulano particolari carotenoidi. I carotenoidi sono composti di tipo terpenico la cui sintesi, almeno nei primi passaggi, è comune a quella di tutti gli altri terpeni (Taiz e Zeiger, 2009). La separazione dalla via generale di sintesi dei terpeni avviene con la formazione del fitoene ad opera della fitoene sintasi (PSY). Oltre ai carotenoidi che si accumulano nei plastidi, esiste anche un altro gruppo di pigmenti nelle piante che può determinare il cambiamento di colore nel frutto: i flavonoidi e gli antociani. Questi metaboliti secondari sono un'ampia classe di sostanze colorate di natura

Introduzione

fenolica che comprendono le antocianine, i flavoni, i flavonoli e gli isoflavoni. Essi danno una grande varietà di colori dal giallo fino al blu-viola e vengono accumulati nei vacuoli delle cellule. Un esempio è dato dai frutti di fragola oppure dai mirtilli. Anche se non l'unico, il modo più comune con cui si formano i fenoli nelle piante prevede la trasformazione dell'aminoacido aromatico fenilalanina in acido trans-cinnamico (il diretto precursore dei fenoli) da parte dell'enzima fenilalanina-ammonio liasi (PAL). Un enzima chiave però è la calcone sintasi (CHS) la quale, agendo più a valle, porta direttamente alla sintesi dei composti colorati (Taiz e Zeiger, 2009).

Il rammollimento dei frutti carnosì è un processo molto studiato poiché di grande importanza per la commercializzazione della frutta, dato che più un frutto è tenero minore è la sua conservabilità post-raccolta. In altre parole, il grado di rammollimento di un frutto carnoso ha delle grosse ricadute di tipo economico perché può far variare il modo in cui viene raccolto (a mano oppure meccanicamente), può incidere sulla possibilità di trasportarlo per distanze più o meno lunghe, ma anche sulla sua deperibilità e quindi la sua durata in condizioni integre, e la sua suscettibilità ai patogeni.



Figura 3: Due frutti che a maturazione presentano un grado di rammollimento diverso. Il caco (www.vitatrentina.it/.../caco_large.jpg) presenta un rammollimento della polpa molto più accentuato rispetto alla mela (<http://www.freshplaza.com/2009/1110/pinklady.jpg>)

I frutti carnosì hanno tipicamente cellule con una parete primaria di tipo pectocellulosico. Le pareti cellulari primarie sono composte in percentuali variabili da cellulosa, emicellulose, pectine, proteine e da basse concentrazioni di

sostanze varie. Le componenti che più sono coinvolte nel processo di rammollimento sono le pectine e le emicellulose. Quando inizia la maturazione si assiste ad un parziale disassemblamento delle pareti delle cellule del frutto: aumenta l'idratazione della parete e le pectine vengono modificate ed in parte idrolizzate. Le pectine sono particolarmente importanti perché, oltre ad essere presenti in elevate quantità nella parete primaria, sono il costituente predominante della lamella mediana che, essendo comune a due cellule adiacenti, si può considerare come un collante che le tiene unite. Quindi, una degradazione pronunciata delle pectine ha effetti significativi sui contatti cellula-cellula e, di conseguenza, sulla consistenza dei tessuti del frutto. Questa degradazione è geneticamente determinata e vede coinvolti molti enzimi ciascuno in grado di agire su substrati diversi. Data l'importanza economica che riveste quest'aspetto della maturazione, sono stati studiati molti di questi enzimi proprio nel tentativo di controllare il grado di rammollimento dei frutti carnosi (Brummell and Harpster, 2001). La poligalatturonasi (PG) di pomodoro è l'enzima degradativo della parete che è stato più studiato. Ciò è dovuto in larga parte al fatto che le prime osservazioni avevano mostrato un'elevata attività di PG in corrispondenza del rammollimento (Brady et al., 1982). La PG in particolare depolimerizza le pectine attraverso un taglio idrolitico; la trascrizione del gene relativo è attiva durante la maturazione e il promotore di PG contiene degli elementi di controllo maturazione-specifici dipendenti dall'etilene (Sitrit and Bennett, 1998). L'attività della PG da sola però non è sufficiente ma è necessario l'intervento di un altro enzima degradativo, la pectinmetilesterasi (PME). Questo enzima, che agisce sempre sulle pectine, è responsabile della de-metilazione dei poligalatturonani della parete cellulare rendendo così questi polimeri maggiormente suscettibili all'azione della poligalatturonasi dato che quest'ultimo enzima sembra poter agire solo dopo che i gruppi metilici sono stati rimossi dall'acido galatturonico (Brummell and Harpster, 2001). Sempre in pomodoro è stata studiata anche la β -galattosidasi. Essa agisce precocemente durante la maturazione tagliando le catene laterali dei ramnagalatturonani di tipo I (pectine ramificate); in questo modo aumenta la porosità della parete e facilita l'ingresso in parete di altre categorie di enzimi degradativi che possono così avere un maggiore accesso ai loro substrati. Mutanti di pomodoro in cui si verifica una soppressione dell'attività della β -galattosidasi durante le prime fasi della maturazione presentano una significativa riduzione del rammollimento del frutto (Brummell and Harpster, 2001). Un altro enzima degradativo che agisce a livello

Introduzione

della parete cellulare delle cellule vegetali è la pectato liasi (PL) che catalizza il taglio delle pectine de-esterificate tramite una reazione di β -eliminazione. La PL è stata profondamente studiata nei batteri patogeni che usano questo enzima per depolimerizzare le pectine della lamella mediana e della parete primaria delle piante superiori (Celia Marin-Rodriguez et al., 2002). Sequenze di PL sono state trovate anche in banana, uva e fragola. Inoltre, proprio in fragola è stato visto che il silenziamento di un gene codificante per una PL di maturazione portava ad un minor rammollimento dei frutti (Jiménez-Bermúdez et al., 2002). Alcuni risultati interessanti riguardanti le modificazioni strutturali dei frutti durante la maturazione sono emersi dall'analisi di un'espansina (EXP) di pomodoro. Le espansine sono proteine di parete presenti in numerosi tessuti nei quali sono in corso cambiamenti (spesso anche rapidi) di forma e dimensione. Le espansine sono proteine senza un'evidente attività idrolitica, e sembra che questi enzimi agiscano rompendo i legami idrogeno tra le microfibrille di cellulosa e la matrice polisaccaridica. Ciò porterebbe ad una destabilizzazione della parete favorendo quindi l'accesso di altri enzimi idrolitici (Cosgrove, 2000). In conclusione, i numerosi studi compiuti sul rammollimento dei frutti carnosì hanno permesso di capire come non ci sia tanto un singolo enzima ad avere un effetto determinante sul processo, ma sia invece l'azione sinergica e temporalmente sincronizzata di più enzimi ad essere importante per il rammollimento (Payasi et al., 2009).

La produzione di aromi è un processo complesso che vede coinvolte molte vie metaboliche (Baldwin et al., 2000). In generale, è molto difficile tracciare un profilo completo delle sostanze prodotte dal frutto poiché fra gli aromi ci possono essere sostanze sia solubili sia volatili, tra cui molti alcoli, aldeidi ed esteri (nel pomodoro ad esempio sono state identificate più di 400 sostanze volatili). Inoltre, alla formazione degli aromi contribuisce anche il processo di rammollimento che, a seguito della degradazione delle pareti cellulari, fornisce substrati che possono esaltare le qualità aromatiche di un frutto. Ad esempio, utilizzando piante transgeniche di pomodoro in cui era silenziata l'espressione della pectinmetilesterasi (PME), si è visto che i frutti avevano ridotte quantità di metanolo che può agire da solvente per molecole scarsamente solubili in acqua (Baldwin et al., 2000). A causa della sua complessità, la formazione degli aromi è un processo ancora poco noto anche se attualmente è molto studiato, data la sua importanza come componente basilare delle proprietà organolettiche di un frutto carnoso.

Introduzione

La regolazione del processo di maturazione del frutto è data perlopiù da fattori di tipo ormonale. In particolare, i frutti sono stati divisi in due grandi classi, climaterici e non climaterici. I frutti climaterici presentano un aumento caratteristico della respirazione (climaterio respiratorio) prima della fase di maturazione che si accompagna a un aumento nella produzione di etilene (climaterio etilenico). Pesche, banane, avocado e pomodori sono alcuni esempi di frutti climaterici. Invece frutti come gli agrumi e l'uva non presentano un aumento né della respirazione né della produzione di etilene e sono chiamati frutti non climaterici (figura 4). Una conseguenza molto importante delle caratteristiche appena descritte è che l'etilene svolge un ruolo fondamentale nella maturazione dei frutti climaterici ma non in quella dei frutti non climaterici. Poiché fra i frutti climaterici ve ne sono alcuni di enorme importanza economica (ad esempio il pomodoro), tutto ciò che riguarda l'etilene (biosintesi e via di signaling) è stato molto studiato in tutto il mondo.

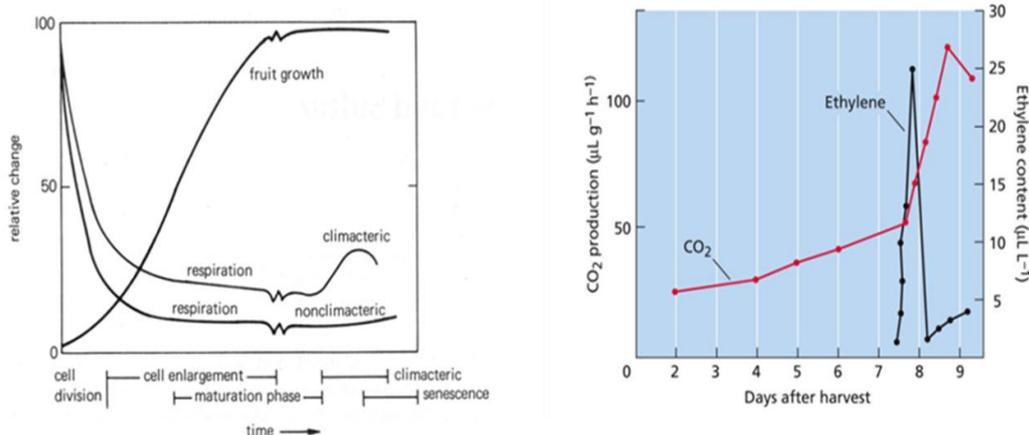


Figura 4: Il grafico di sinistra mostra la differente respirazione nei frutti climaterici e nei frutti non climaterici (da Salisbury e Ross, 1978) mentre il grafico a destra mostra sia il caratteristico aumento di respirazione di un frutto climaterico in maturazione che il picco corrispondente di etilene (da Taiz e Zeiger, 2009).

La via di sintesi dell'etilene è ben conosciuta nelle piante superiori: l'etilene viene prodotto a partire dalla L-metionina attraverso la formazione di S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) che viene poi trasformata in acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC), il precursore diretto dell'etilene. Il primo enzima che interviene è la SAM sintetasi (o AdoMet sintetasi) che converte la metionina in SAM in presenza di ATP e Mg^{2+} . Questo viene poi convertito in

Introduzione

ACC per opera dell'ACC sintasi (ACS) ed infine la conversione di ACC in etilene avviene grazie all'ACC ossidasi (ACO). L'ACS produce inoltre 5'-metiltioadenosina che viene usata per la sintesi di nuova metionina attraverso il ciclo di Yang (Alexander and Grierson, 2002). Il fattore limitante della via è la conversione dell'AdoMet in ACC, catalizzata da ACS, un enzima citosolico instabile la cui concentrazione, molto bassa nei tessuti vegetali, è regolata da diversi fattori sia ambientali sia interni quali ad esempio le ferite, lo stress idrico, l'allagamento e le auxine. Inizialmente si pensava che l'attività di ACS fosse il passaggio chiave nel controllo della produzione di etilene e che l'attività di ACO fosse costitutiva (Yang and Hoffman, 1984). In realtà negli ultimi anni il ruolo di ACO è diventato più chiaro: nei frutti pre-climaterici la crescita dell'attività di ACO, in risposta all'etilene, precede quella di ACS, indicando che anche ACO è importante per il controllo della sintesi di questo ormone (Lui et al., 1985). Sono stati proposti due sistemi di regolazione della produzione di etilene:

1. il primo sistema funziona durante la normale crescita vegetativa: è responsabile della produzione di etilene a livelli basali in tutti i tessuti, compresi quelli dei frutti non climaterici e non è autocatalitico;
2. il secondo sistema opera soprattutto durante la maturazione dei frutti climaterici e in questo caso l'ormone stesso è in grado di stimolare la sua biosintesi che procede così in modo autocatalitico (Alexander and Grierson, 2002).

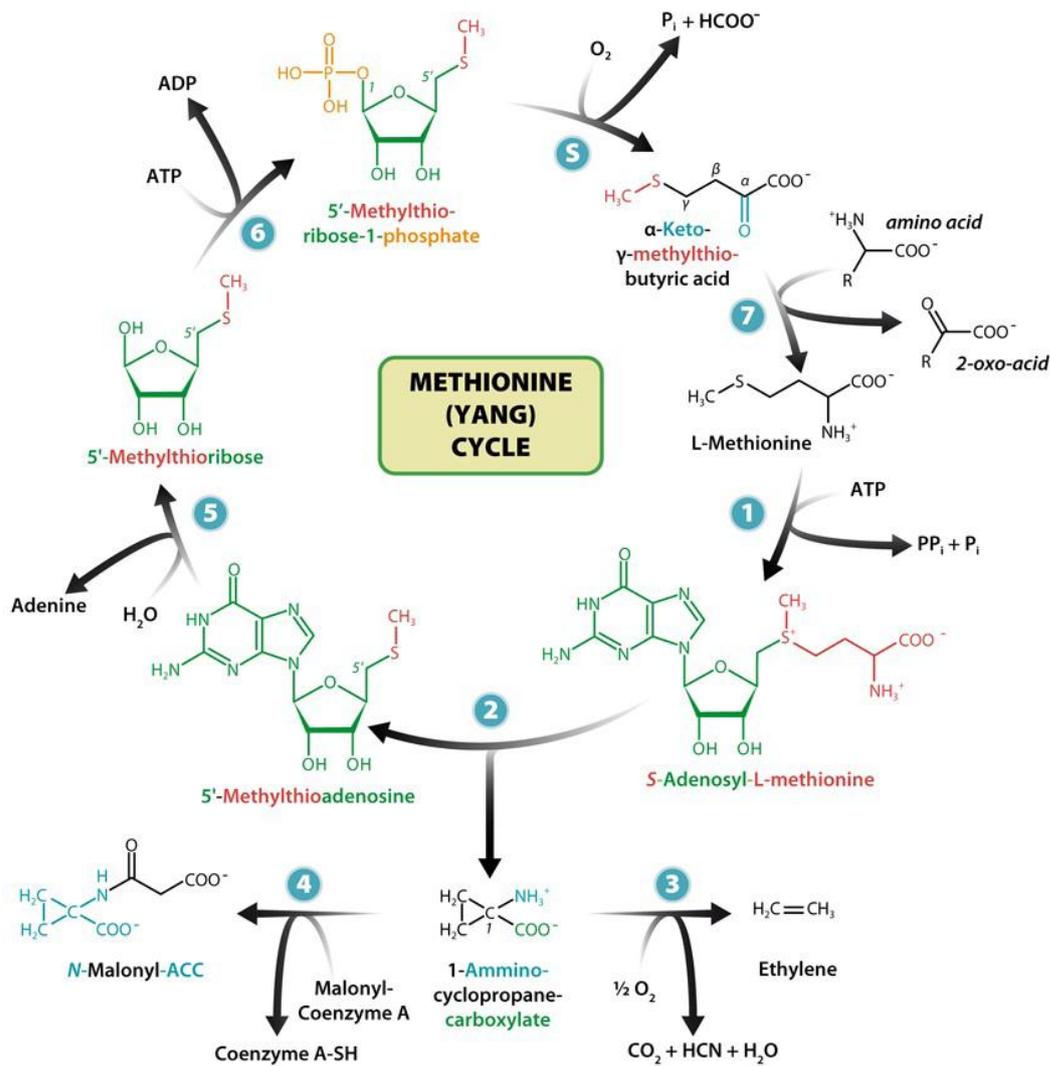


Figura 5: Biosintesi dell'etilene: 1) SAM sintetasi; 2) ACC sintasi; 3) ACC ossidasi; 4) ACC N-malonil-transferasi; 5) MTA nucleosidasi; 6) MTR kinasi; 7) transaminasi; S) reazione spontanea (modificato da www.freebase.com/view/wikipedia/models).

Anche se ben conosciuto a grandi linee, l'esatto meccanismo di trasduzione del segnale dell'etilene non è stato ancora completamente chiarito in tutte le sue parti. Un grande aiuto lo si è avuto dall'analisi di mutanti di *Arabidopsis thaliana* per la risposta all'etilene. Questi mutanti hanno portato all'identificazione di cinque recettori per l'etilene e molti altri componenti della via di trasduzione del segnale. I recettori per l'etilene sono codificati da una famiglia di geni che codificano proteine simili ai recettori istidin-kinasi a due componenti dei batteri, con la differenza che nelle piante i due componenti sono riuniti in un'unica

proteina. Queste proteine sono composte da due elementi funzionali: un sensore istidina kinasi, costituito da un dominio transmembrana per il legame dell'etilene e un dominio istidin-kinasico vero e proprio, e un regolatore di risposta che possiede il dominio ricevitore. Il legame dell'etilene, mediato dal cofattore rame, regola l'attività del dominio istidin-kinasico che autofosforila un residuo conservato di istidina. Il fosfato viene poi trasferito al dominio ricevitore che attiva la via di risposta all'etilene. In *Arabidopsis* il recettore *ETR1*, in presenza di etilene, agisce da regolatore negativo di *CTR1*, una protein-kinasi che normalmente blocca la via di risposta all'etilene. La disattivazione di *CTR1* favorisce l'attività della proteina *EIN2* che porta all'attivazione della cascata trascrizionale. Dall'analisi dei fattori che intervengono nella via di signaling dell'etilene in pomodoro, si è visto che, se i tessuti vengono esposti ad alte concentrazioni di etilene, si può verificare un'alterazione dell'espressione genica in modo tale da garantire una risposta all'etilene durante la maturazione climaterica (Giovannoni, 2004).

1.3 I GENI MADS-box

I geni MADS-box costituiscono un elemento fondamentale per lo sviluppo dei fiori, dal momento che svolgono funzioni di tipo omeotico specificando l'identità dei vari organi presenti in queste strutture riproduttive delle Angiosperme. Ciò è reso evidente da loro eventuali alterazioni che portano alla sostituzione di una parte con un'altra, tipica di un diverso verticillo (figura 6).



Figura 6: Esempio di alterazione dell'espressione di un gene MADS-box. In (A) un fiore wild type di pomodoro. In (B) il fiore risultante dall'espressione ectopica di un gene di classe C di pesco in pomodoro. Si può notare come nel fiore sia visibile solo il calice, con tutti i suoi elementi fusi

Introduzione

insieme a mo' di ovario, dal quale fuoriesce lo stilo con lo stigma (Laboratorio Casadoro: foto originali).

I geni MADS-box, però, non rappresentano una prerogativa del regno vegetale poiché sono presenti anche in animali e funghi, seppur con funzioni differenti. Questo può far supporre che sia esistito, circa un miliardo di anni fa, un progenitore comune ai tre taxa provvisto di almeno un rappresentante di questi geni (Theissen et al., 1996). Il nome MADS è un acronimo formato dalle iniziali dei primi quattro geni individuati come appartenenti a questa classe: *MCM1* (*MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1*), implicato nella determinazione del tipo sessuale in lievito, *AGAMOUS* e *DEFICIENS*, geni che regolano l'identità florale rispettivamente in *Arabidopsis thaliana* ed *Antirrhinum majus*, *SRF* (*Serum Response Factor*) in mammifero. La famiglia genica MADS-box può essere suddivisa in tre gruppi principali: MEF2-like, SRF family e MIKC. I primi due gruppi sono caratteristici di animali e funghi, mentre l'ultimo sembra essere esclusivo delle piante. Le funzioni connesse alle tre tipologie di geni MADS-box sono diverse, ma comunque legate al controllo dello sviluppo e del differenziamento cellulare. Inoltre, in contrasto con quanto riscontrato nei geni omeotici HOX animali, i MADS-box delle piante sono distribuiti in tutto il genoma (Theissen et al., 2000). I geni di tipo MIKC presentano una struttura modulare, comune a numerosi altri fattori di trascrizione eucariotici, i cui elementi si affiancano al dominio MADS. Per poter agire legandosi al DNA, questi fattori di trascrizione devono prima formare dei dimeri, ma anche tetrameri (sia -omo che etero-) (Theissen, 2001).

Dal punto di vista funzionale possiamo distinguere nelle proteine MADS diversi domini (figura 7 A):

1. **Dominio M:** la regione MADS, di circa 60 amminoacidi, è la porzione più conservata e costituisce un dominio multifunzionale il cui principale compito consiste nel permettere il legame della proteina al DNA, oltre ad essere coinvolto nel processo di dimerizzazione ed interazione con ulteriori fattori di trascrizione. Il legame con il DNA avviene lungo il solco minore (Pellegrini et al., 1995) ed è consentito da una struttura formata da α -eliche antiparallele e foglietti β (Immick et al., 2010) che riconoscono

una sequenza consenso CC(A/T)₆GG, denominata CarG box, presente nelle regioni promotoriali dei geni regolati da fattori di trascrizione MADS.

2. **Dominio I** (intervening): comprende normalmente circa 30 amminoacidi, ma la sua lunghezza è variabile potendo arrivare fino a 66/85 amminoacidi. Alcuni dati dimostrano il suo coinvolgimento nella formazione di un' α -elica coinvolta nel legame al DNA e nella dimerizzazione di due proteine (Riechmann et al., 1996).
3. **Dominio K** (keratin-like): di circa 70 amminoacidi, risulta conservato, anche se meno rispetto al dominio M, e presenta al suo interno residui idrofobici inseriti con una regolarità che può essere spiegata mediante la formazione di eliche anfipatiche, necessarie per l'interazione con il dominio K di un'altra proteina MADS-box (figura 7 B), favorendo così la formazione di dimeri (Shore et al., 1995). Recentemente è stato proposto un modello in cui il dominio K si ripiega in tre α -eliche anfipatiche: le prime due (K1 e K2) sono importanti, insieme alla regione terminale del dominio M, per determinare la formazione dei dimeri, mentre la terza elica (K3), assieme al dominio C-terminale (figura 7C), sembra abbia un ruolo nella formazione di complessi tetramerici (Immick et al., 2010).
4. **Dominio C**: è in assoluto la regione con la maggior variabilità sia in lunghezza che in sequenza. La funzione di questa regione è ignota, ma non risulta essere indispensabile per la dimerizzazione della proteina ed il legame al DNA (Homna e Goto, 2001): si pensa piuttosto ad un suo coinvolgimento nella promozione della formazione di complessi multimerici (Cho et al., 1999; Egea-Cortines et al., 1999; de Folter and Angenent, 2006) e nell'attivazione della trascrizione (Ito et al., 2008).

In alcuni casi è stata riscontrata la presenza di residui amminoacidici in posizione N-terminale rispetto al dominio M e, se ciò avviene, questi si definiscono NMIKC-type.

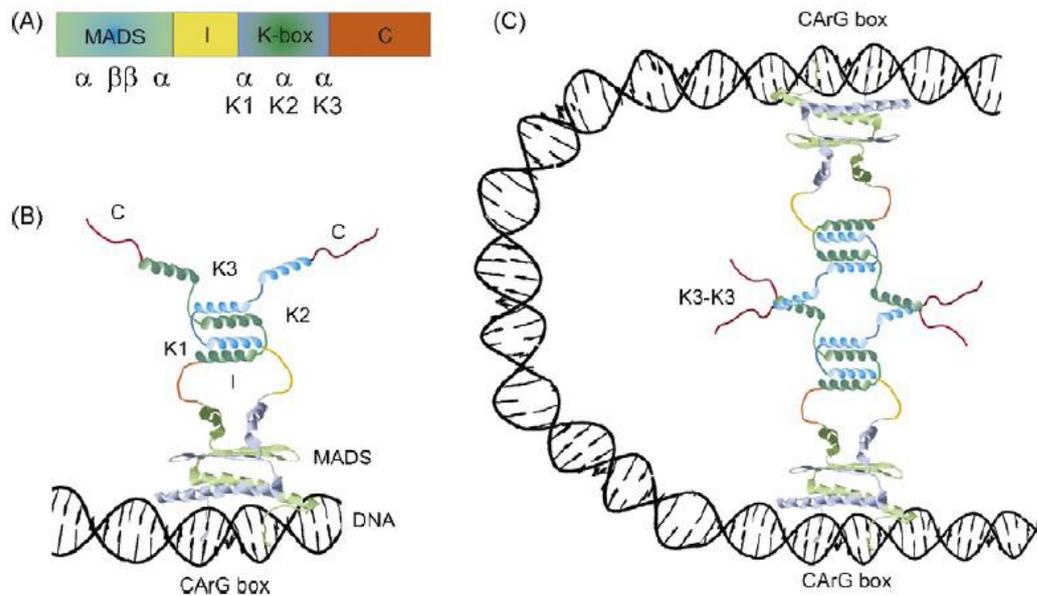


Figura 7: Struttura modulare di una proteina MADS-box di tipo MIKC (A). Un dimero di fattori di trascrizione di tipo MADS-box contattano il DNA in corrispondenza della regione CArG box (B). Un'ipotetica struttura 3D evidenzia l'interazione di due dimeri con la doppia elica del DNA (C) (da Immink et al., 2010).

Poiché i fattori di trascrizione di tipo MIKC sono responsabili dello sviluppo del fiore, grande impulso è stato dato al loro studio in ambito vegetale. L'analisi di molti mutanti omeotici ha portato Meyerowitz e Coen (1991) a proporre il modello ABC per spiegarne il ruolo. Secondo questo modello l'identità delle varie parti del fiore è determinata da tre classi di geni, per la maggior parte codificanti fattori di trascrizione di tipo MADS, che determinano lo sviluppo dei verticilli fiorali (il modello ABC si è basato prevalentemente sull'analisi di mutanti di *Arabidopsis thaliana*). L'attività espressa dalla classe A, codificata da *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA2* (*AP2*) (quest'ultimo gene non è un MADS-box), controlla l'identità dell'organo nel primo e nel secondo verticillo; l'attività espressa dalla classe B, codificata da *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*), controlla invece la determinazione degli organi nel secondo e terzo verticillo. Infine l'attività espressa dalla classe C, codificata da *AGAMOUS* (*AG*), controlla lo sviluppo nel terzo e quarto verticillo. Quindi i geni di classe A da soli specificano la formazione dei sepali mentre la formazione dei petali richiede sia i geni di classe A che i geni di classe B; gli stami sono prodotti invece dalla combinazione delle attività delle

Introduzione

classi B e C mentre l'attività della sola classe C specifica la formazione dei carpelli. Il modello prevede inoltre che le classi A e C siano mutuamente antagoniste cosicché la mancanza di A consente l'espressione dei geni di tipo C anche nelle regioni dove solitamente sono espressi i geni di classe A e viceversa (Soltis et al., 2007). Negli ultimi anni questo modello è stato modificato con l'aggiunta della classe E, codificata dai geni *SEPALLATA* (*SEP*). Diversamente dalle altre, quest'ultima classe è espressa in tutti i verticilli ed è in grado di influenzare lo sviluppo di tutti e quattro i verticilli fiorali. Così, nel mutante di *Arabidopsis* in cui tre dei quattro geni *SEPALLATA* sono mutati, il fiore produce solo sepal, anche se i geni di classe B e C sono regolarmente espressi (Pelaz et al., 2000). Esiste infine una quinta classe di geni, la classe D, che è implicata nel controllo dello sviluppo dell'ovulo. In seguito alle scoperte fatte negli ultimi anni, il classico modello ABC è stato rinominato "modello ABCDE" ed è stato ulteriormente sviluppato proponendo il "modello a quartetto" (Theissen, 2001) che cerca di spiegare come differenti combinazioni di queste proteine nella formazione di tetrameri (quartetti) riescano a determinare l'identità dei vari organi fiorali (figura 8). Il modello propone che quattro differenti combinazioni di quattro fattori di trascrizione di tipo MADS-box formino complessi proteici in grado di contattare i promotori di specifici geni e regolarne così l'espressione. L'esatta struttura proteica e le dinamiche di interazione sono ancora oggetto di studio.

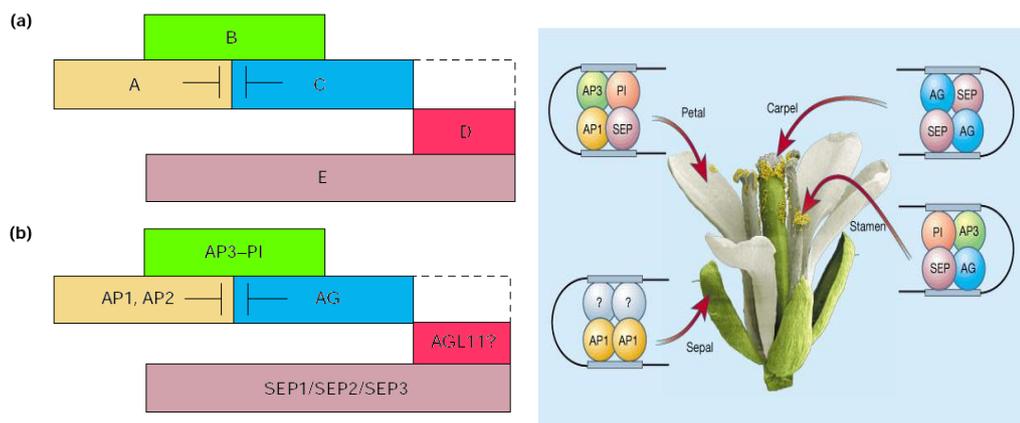


Figura 8: La figura a sinistra illustra il modello ABCDE applicato ad *Arabidopsis thaliana* (modificato dal lavoro di Theissen, 2001) mentre a destra è rappresentato lo sviluppo floreale, sempre in *Arabidopsis*, secondo il "modello a quartetto" (da Theissen e Saedler, 2001).

Oltre al loro ruolo nella formazione dei fiori, negli ultimi tempi si è scoperto che i fattori di trascrizione MADS-box sono coinvolti anche nel processo di sviluppo dei frutti sia secchi che carnosi. Infatti, per quanto riguarda la siliqua della pianta modello *Arabidopsis thaliana*, sono da ricordare alcuni geni codificanti fattori di trascrizione di tipo MADS-box che regolano la formazione della zona di deiscenza necessaria alla dispersione dei semi (*SHATTERPROOF 1* e *2*), a loro volta controllati negativamente da geni che ne limitano l'espressione a zone specifiche, come ad esempio *FRUITFULL* (Ferrandiz, 2002). Recentemente è stato visto che fattori di trascrizione di tipo MADS-box sono coinvolti anche nello sviluppo e maturazione dei frutti carnosi. In particolare, nel caso del frutto di pomodoro si è visto che il silenziamento di *TAGL1*, un gene MADS-box di classe C, dimostra il suo ruolo nel normale accumulo di carotenoidi, nel processo di degradazione delle clorofille e nell'espressione di alcuni geni associati alla maturazione (Itkin et al., 2009; Vrebalov et al., 2009). Oppure la sovraespressione, sempre in pomodoro, di un gene MADS-box di classe C di pesco (*PpPLENA*) porta alla trasformazione dei sepali, normalmente fogliacei, in strutture carnose molto simili ai frutti che nel corso dello sviluppo vanno incontro a maturazione (Tadiello et al., 2009).



Figura 9: L'immagine a sinistra mostra il frutto di un pomodoro 35S::*PpPLENA*, dove si può notare la presenza di sepali carnosì. A destra un ingrandimento del sepal carnosò in maturazione (Laboratorio Casadoro: foto originali).

Anche il coinvolgimento di altri geni MADS-box, come ad esempio *FaMADS9* e *LeMADS-RIN*, entrambi appartenenti al gruppo dei *SEPALLATA*, si è dimostrato importante per lo sviluppo dei frutti carnosì. Nel primo caso il suo silenziamento inibisce la corretta formazione degli acheni e del ricettacolo carnoso di *Fragaria x ananassa* (Seymour et al., 2011), mentre nel secondo caso la sola mutazione del gene *LeMADS-RIN* provoca la non maturazione del frutto di pomodoro (Vrebalov et al., 2002). Questo dimostra come i geni MADS-box abbiano un ruolo importante e universale nello sviluppo dei frutti in quanto sono coinvolti nelle vie che regolano la maturazione dei frutti veri, sia che siano secchi (*Arabidopsis*) o carnosì (pomodoro, pesco), ma anche nei “falsi” frutti (come nel caso del ricettacolo carnoso di fragola).

1.4 LE GIMNOSPERME

Le Gimnosperme (dal greco *gymnós*, nudo e sperma, seme) rappresentano una sottodivisione delle piante a seme, le Spermatofite, nelle quali però gli ovuli, a differenza delle Angiosperme, non sono ricoperti da carpelli richiusi a formare un ovario, ma presentano ovuli collocati su sporofilli ed esposti all'ambiente. Tutte le Gimnosperme attuali, come anche quelle di cui ci è rimasta testimonianza fossile, sono piante legnose, a legno omoxilo, il cui *habitus* è di norma arboreo od arbustivo. Le più antiche Gimnosperme conosciute sono state ritrovate allo stato fossile in sedimenti risalenti al Devoniano superiore. Le prime Gimnosperme si sono probabilmente evolute da una divisione estinta di Crittogame Vascolari, le *Progymnospermophyta*, con foglie simili a quelle delle Felci attuali ma recanti caratteristiche strutture, rassomiglianti ai semi delle Gimnosperme, sul margine fogliare e non sulla pagina abassiale (Raven, 2002). Le Gimnosperme hanno dominato gli ecosistemi terrestri anche dopo la comparsa delle Angiosperme, circa 135 milioni di anni fa, fino a 80 milioni di anni fa. Comunque, ancora oggi popolazioni di piante appartenenti alle *Coniferales* risultano essere la componente principale di estese foreste nelle regioni temperate (Raven, 2002).

Le specie di Gimnosperme sopravvissute possono essere raggruppate in quattro differenti phyla: *Cycadophyta*, *Ginkgophyta*, *Coniferophyta*, e *Gnetophyta*. La terminologia tassonomica adottata fa riferimento al testo “Biologia delle Piante” (Raven, 2002).

Introduzione

Il phylum *Cycadophyta* comprende 11 generi e circa 140 specie. La maggior parte delle *Cicadee* è rappresentata da piante di grandi dimensioni che possono raggiungere anche i 18 metri di altezza. Molte di queste hanno un fusto ben definito, costituito dalle basi fogliari rimaste dopo la caduta delle foglie, che svolgono il principale ruolo di sostegno dell'albero. Le foglie funzionali sono addensate in una corona all'apice del fusto conferendo così alla pianta un aspetto molto simile a quello delle palme. Queste piante, essendo in grado di ospitare cianobatteri, svolgono un ruolo fondamentale nel processo di fissazione dell'azoto atmosferico negli ambienti in cui vivono.

Il phylum *Ginkgophyta* è costituito da un'unica specie superstite, il *Ginkgo biloba*. Di essa sono stati ritrovati resti fossili, risalenti a 150 milioni di anni fa, che mostrano come questa specie sia rimasta pressoché inalterata durante questo lunghissimo periodo di tempo, e per questa ragione è considerato un "fossile vivente". Attualmente non esistono popolazioni allo stato selvatico di questa pianta ed essa è giunta sino a noi solo attraverso l'opera di conservazione attuata dai monaci buddisti cinesi e giapponesi. *Ginkgo biloba* è una specie arborea dioica, caducifolia, che può raggiungere i 30 metri di altezza, i cui ovuli sono portati in coppia all'estremità di un peduncolo. Le foglie presentano nervature ramificate dicotomicamente, quelle dei rami più corti si presentano intere mentre quelle dei rami più lunghi o delle plantule sono bilobate, esse sono riunite in piccoli gruppi all'estremità di brachiblasti. Una particolarità tipica sia di *Ginkgo* che delle *Cycadophyta* è costituita dalla presenza di gameti maschili mobili.

Il phylum *Coniferophyta* è, tra le Gimnosperme, quello più ricco di forme viventi, le quali vengono organizzate in 50 generi e 550 specie, aventi tra loro notevoli differenze; sono piante legnose, monoiche oppure dioiche. Le Conifere sono più frequentemente degli alberi che possono raggiungere dimensioni anche gigantesche: la *Sequoia sempervirens*, per esempio, può anche raggiungere i 100 metri di altezza. In altre Conifere invece, come *Juniperus communis*, l'abito è cespuglioso. Normalmente le Conifere viventi, esclusi i Pini, presentano un ciclo riproduttivo annuale in quanto i semi giungono a maturazione nella medesima stagione in cui gli ovuli sono stati fecondati.

Il phylum *Gnetophyta* comprende tre gruppi di piante: *Gnetum* con 30 specie, *Ephedra* con 40 specie e *Welwitschia* con *Welwitschia mirabilis* come unica

Introduzione

specie del gruppo. *Gnetum*, un genere di piante con habitat pantropicale, è costituito per la maggior parte da liane o da piccoli arbusti, con foglie espanse che ricordano quelle delle dicotiledoni. Le piante di *Ephedra* sono arbusti o cespugli resistenti che crescono nella regione mediterranea e nelle regioni desertiche del continente americano, oltre che in Asia. Hanno foglie ridotte e squamiformi per cui sono i rametti verdi ad effettuare la fotosintesi. I pochi esemplari di *Welwitschia*, in natura, si trovano solo nei deserti dell’Africa sud-occidentale. Queste piante possiedono un fusto corto e largo che presenta una grossa porzione ipogea, con solamente due foglie che continuano a crescere indefinitamente lacerandosi all’estremità distale nel corso dello sviluppo. Tutti e tre i generi hanno la caratteristica particolare di avere trachee nel loro legno, pur essendo Gimnosperme. Inoltre, ci sono elementi della riproduzione che, anche se non uguali dal punto di vista funzionale, ricordano analoghe caratteristiche tipiche delle Angiosperme come, ad esempio, una pseudo-doppia fecondazione. Tutto ciò ha fatto ritenere per lungo tempo che le *Gnetofite* potessero rappresentare il gruppo da cui si sono originate le Angiosperme. In realtà, studi di filogenesi molecolare hanno dimostrato come le *Gnetofite* siano Gimnosperme a tutti gli effetti (Bowe et al., 2000) e non possano essere considerate come dei progenitori delle Angiosperme, per cui il mistero dell’origine di queste ultime continua a restare tale.

Nonostante i frutti siano una caratteristica propria delle piante a fiore, anche alcune specie di Gimnosperme avvolgono i loro semi con una struttura carnosa. Essa non può essere considerata un frutto dal punto di vista botanico perché non deriva dalla trasformazione dell’ovario fecondato, ma lo è dal punto di vista funzionale dato che favorisce la dispersione dei semi a cui si accompagna (figura 10).



Introduzione

Figura 10: A sinistra sono raffigurati “frutti” di *Juniperus communis* (da <http://www.agraria.org/coltivazionierbacee/aromatiche/ginepro.htm>). A destra un esempio di dispersione dei semi di ginepro.

Esempi di Gimnosperme che producono questi particolari “frutti” carnosì si trovano in tutti quattro i phyla. Tra le *Coniferophyta* troviamo il genere *Juniperus* che racchiude i propri semi in una pseudobacca squamosa e pruinosa di colore bluastro, chiamata galbulo, composta da quattro squame carnose saldate tra di loro (figura 10). Un altro esempio, sempre tra le *Coniferophyta*, è *Taxus baccata*, un albero sempreverde caratterizzato da un’elevata tossicità di rami, foglie e semi. L’unica parte non velenosa della pianta è l’arillo, ovvero una struttura carnosa che ricopre il seme (figura 11). Questo “frutto”, il cui colore è inizialmente verde per poi divenire rosso a maturità, contiene un solo seme, duro e molto velenoso. La formazione dell’arillo non è legata alla modificazione di strutture preesistenti, ma avviene *ex novo* durante la trasformazione dell’ovulo in seme (Lovisetto, 2007).



Figura 11: A sinistra seme di *Taxus baccata* (da <http://flickr.com/photos/96972102@N00/1723640087>). A destra fotografia al microscopio ESEM di un giovane ovulo di tasso. OV: ovulo; A: l’arillo in formazione alla base dell’ovulo si posiziona tra l’ovulo stesso e le brattee; B: brattee (Lovisetto, 2007)

In *Ginkgo biloba* invece gli ovuli maturano e producono semi rivestiti da un involucro carnoso, il sarcotesta, che si sviluppa dal tegumento ovulare esterno ed è di colore giallastro a maturità (figura 12). Al suo interno vi è una parte legnosa (sclerotesta) che contiene l’embrione. L’aspetto di questo “frutto” è simile a quello di una drupa e la fecondazione dell’ovulo avviene dopo che esso si è distaccato dalla pianta madre.

Introduzione



Figura 12: A sinistra sono raffigurati “frutti” di *Ginkgo biloba* (da <http://forestry.about.com/od/forestphotogalleries/ig/Ginkgo-Biloba/>). A destra una sezione di frutto di Ginkgo.

Anche in alcune specie appartenenti al gruppo *Cycadophyta* il seme viene ricoperto da uno strato carnoso vivacemente colorato (figura 13), che si accresce a partire dalla parte esterna del tegumento ovulare, mentre quella interna diviene legnosa. L'ovulo si trasforma così in una struttura dall'aspetto di una drupa.



Figura 13: “Frutti” di *Cycas revoluta* (da http://news.xinhuanet.com/english/2007-09/30/xinsrc_03209043010135621877128.jpg).

Strutture carnose sono presenti anche all'interno del phylum *Gnetophyta*, come nel caso di *Gnetum* che produce un seme ricoperto da un involucro carnoso (figura 14); il “frutto” è inizialmente di colore giallo mentre quando matura diventa viola-rosso o rosso-arancio. In *Ephedra* invece due semi rimangono appaiati in un involucro derivante dal concrescimento delle rispettive brattee, che talvolta

diventano carnose e colorate, simulando l'aspetto di un frutto e quella interna diviene legnosa (figura 14). L'ovulo si trasforma così in una struttura dall'aspetto di una drupa.



Figura 14: A sinistra sono raffigurati "frutti" di *Gnetum gnemon* (da <http://www.botanik.unikarlsruhe.de/garten/fotos-knoch/>) mentre a destra si possono vedere "frutti" di *Ephedra chilensis* (da http://www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2007/11/ephedra_chilensis_1.php).

Si conosce ancora molto poco a proposito dei processi molecolari che regolano la formazione e la maturazione di queste strutture carnose. Inoltre, risulta ignota l'eventuale presenza di processi di maturazione in qualche modo confrontabili con quelli che avvengono nei frutti carnosì delle Angiosperme.

1.5 I GENI MADS-box NELLE GIMNOSPERME

I dati molecolari suggeriscono che il più antico antenato comune tra le Gimnosperme e le Angiosperme sia esistito 300 milioni di anni fa e che esso possedesse già un piccolo gruppo di geni MADS-box (Theissen et al., 1996). Tra le Gimnosperme sono stati isolati pochi geni MADS-box da piante appartenenti ai phyla *Cycadophyta* e *Ginkgophyta* mentre la ricerca si è concentrata maggiormente sui geni MADS-box dei phyla *Coniferophyta* e *Gnetophyta*: il primo, infatti, ha un'importanza ecologica e commerciale mentre il secondo è stato considerato per un lungo periodo il "sister group" delle Angiosperme. Nelle Gimnosperme sono stati isolati geni appartenenti alle classi B e C ma non sono stati scoperti fino ad oggi geni appartenenti alla classe A, che nelle Angiosperme determinano la formazione del perianzio. Questa assenza è legata molto probabilmente alla mancanza di queste strutture negli organi riproduttivi delle Gimnosperme. Analisi funzionali hanno dimostrato come i geni MADS-box isolati

Introduzione

dalle Gimnosperme abbiano la stessa funzione di quelli isolati dalle Angiosperme. In particolare, la sovraespressione in *Arabidopsis* di *DAL2*, un gene MADS-box appartenente alla classe C di *Picea abies*, ha evidenziato come questo fattore di trascrizione svolga la stessa funzione dei geni appartenenti alla medesima classe delle Angiosperme (Tandre et al., 1998). Oppure esperimenti di complementazione hanno dimostrato come l'*AGAMOUS* di *Cycas edentata* svolga lo stesso ruolo del suo ortologo di *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2004).

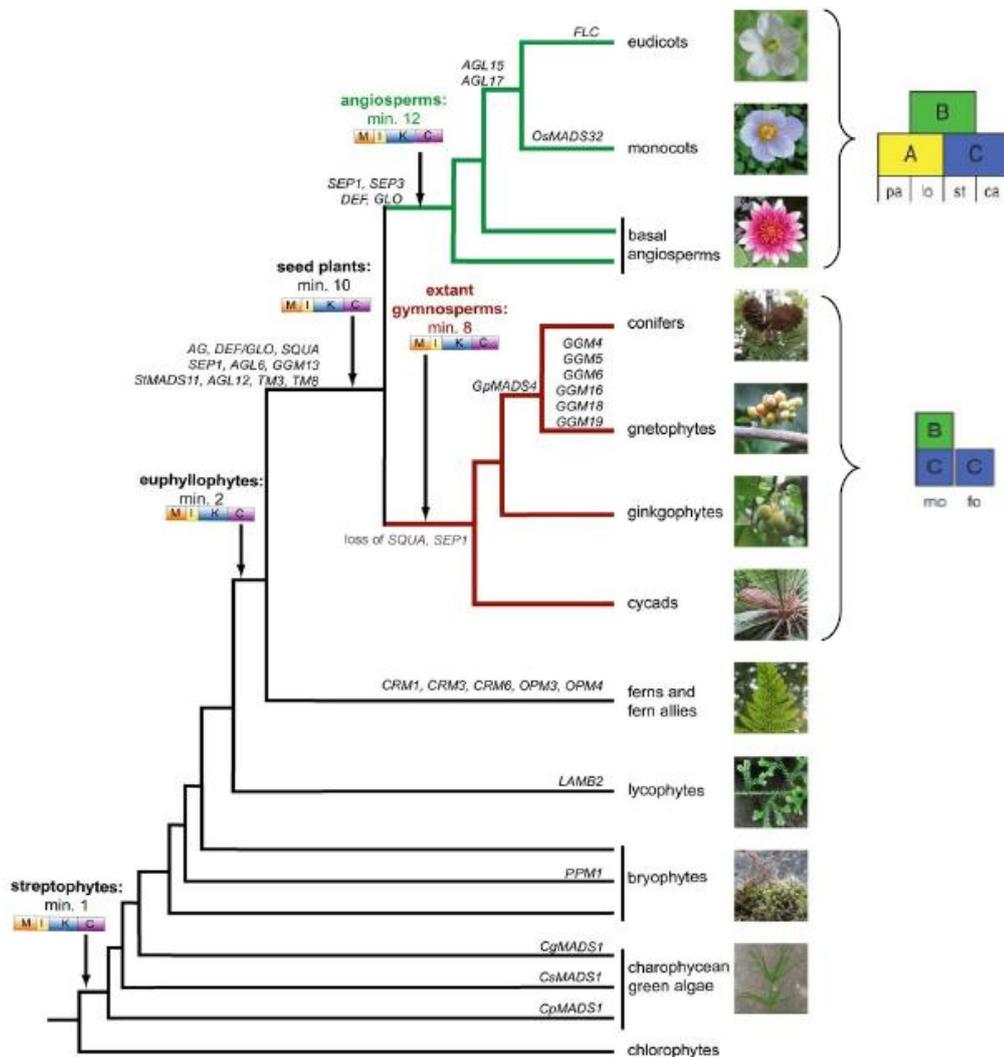


Figura 15 : Albero filogenetico che illustra l'evoluzione dei geni omeotici di tipo MIKC. I rami che definiscono i lineaggi delle Angiosperme e delle Gimnosperme sono evidenziati rispettivamente in verde e in rosso. Accanto ad ogni schema della struttura modulare delle proteine di tipo MIKC è indicato il numero di geni di tipo MIKC presenti in quella determinata discendenza (modificato da Melzer et al., 2010).

I dati presenti in letteratura permettono di associare l'espressione di una versione ancestrale delle funzioni omeotiche B e C alla distinzione degli organi riproduttivi da quelli vegetativi (Tandre et al., 1998; Mouradov et al., 1998) mentre le funzioni svolte dalla classe B sono necessarie per distinguere gli organi riproduttivi maschili da quelli femminili (Theissen et al., 1996; Winter et al., 1999; Wang et al., 2010).

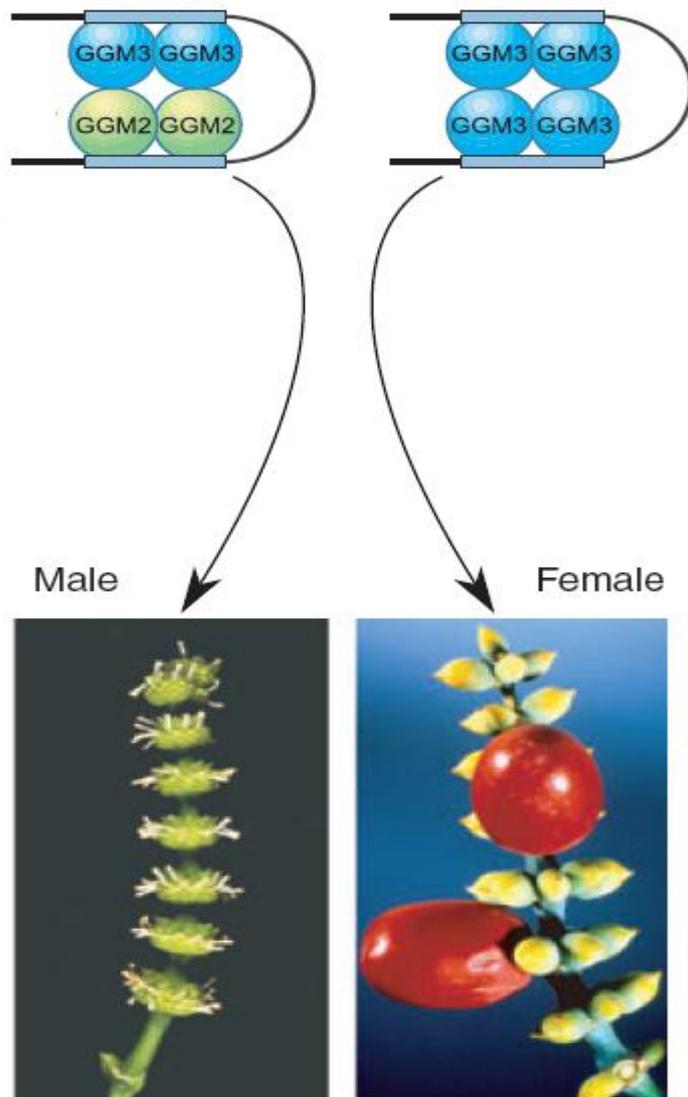


Figura 16 : Formazione delle strutture riproduttive in *Gnetum gnemon*. L'interazione di due fattori di trascrizione MADS-box di classe B (GGM2) con due proteine appartenenti alla classe C (GGM3) porta alla formazione di strobili maschili. L'interazione di quattro proteine GGM3 porta alla formazione di strutture femminili (da Wang et al., 2010).

Introduzione

In alcune specie, oltre agli orologi dei geni di classe B e C, sono stati isolati dei geni MADS-box appartenenti ad altri gruppi. In *Gnetum gnemon* ad esempio è stato isolato il primo rappresentante di un gruppo chiamato *B-sister*, denominato *GGM13*. Il suo omologo *TT16*, in *Arabidopsis*, è coinvolto nella formazione e pigmentazione dei tegumenti esterni del seme (Nesi et al., 2002). Un altro lavoro condotto su *Gnetum parvifolium* ha permesso di identificare *GpMADS3*, un gene appartenente alla classe *AGL6* espresso esclusivamente nei tessuti femminili della pianta (Shindo et al., 1999). La funzione ricoperta da *AGL6* nelle Angiosperme non è ancora stata chiarita con certezza, anche se sembra coinvolto nel determinare la fioritura (Hsu et al., 2003; Fan et al., 2007). Inoltre, alcune analisi filogenetiche hanno dimostrato come esso formi un superclade con i geni *SEPALLATA* a cui appartiene anche il già citato *LeMADS-RIN*, implicato nella maturazione del pomodoro (Vrebalov et al., 2002). Recentemente un lavoro svolto su *Cryptomeria japonica*, una conifera, ha evidenziato la presenza di una serie di geni MADS-box tra cui due appartenenti al gruppo *TM8* (Futamura et al., 2008). Di questo gruppo di geni MADS-box si sa poco se non che sono stati isolati per la prima volta in pomodoro (Pnueli et al., 1994) e da analisi di espressione si è visto che sono presenti anche nel frutto di pomodoro in maturazione (Hileman et al., 2006).

2. SCOPO DEL LAVORO

Nonostante fiore e frutto siano le caratteristiche peculiari delle Angiosperme, alcune Gimnosperme sviluppano delle strutture carnose che avvolgono il seme. Dato che la funzione assolta da queste strutture carnose è, come nel caso dei frutti delle Angiosperme, quella di favorire la dispersione dei semi, è plausibile ipotizzare l'esistenza di elementi comuni anche per quanto riguarda il loro sviluppo e maturazione. Per effettuare un confronto tra i "frutti" delle Gimnosperme e quelli delle Angiosperme ho seguito due strade: da un lato ho analizzato il ruolo di alcuni geni MADS-box nello sviluppo e maturazione delle polpe, dall'altro ho studiato alcuni aspetti della sindrome di maturazione. Ho condotto questo studio in *Ginkgo biloba* e in *Taxus baccata*, due Gimnosperme che sviluppano strutture carnose attorno ai propri semi che, tuttavia, hanno un'origine diversa. Infatti, in ginkgo è il tegumento esterno del seme che nel corso dello sviluppo cresce e diventa carnoso, mentre per quanto riguarda tasso l'arillo si forma *ex novo* alla base dell'ovulo (Lovisetto, 2007).

Il lavoro è iniziato prendendo in considerazione i geni MADS-box poiché codificano per fattori di trascrizione che, oltre ad essere importanti per lo sviluppo degli organi riproduttivi veri e propri, sono importanti anche per lo sviluppo e la maturazione dei frutti. Durante la mia tesi di laurea ho evidenziato come un gene MADS-box di tipo *AGAMOUS* fosse coinvolto nello sviluppo del "frutto" sia di ginkgo sia di tasso. Per la mia tesi di dottorato ho proseguito il lavoro prendendo in considerazione altri fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia MADS-box espressi prevalentemente nelle strutture riproduttive femminili e quindi con maggior probabilità di essere coinvolti anche nello sviluppo del "frutto". Per questo motivo ho studiato geni MADS-box appartenenti al gruppo *AGL6* e *TM8*. Per i primi in particolare è stato anche dimostrato come siano filogeneticamente correlati con i geni *SEPALLATA*, di cui un esempio è *LeMADS-RIN* che in pomodoro controlla la maturazione del frutto (Vebrarov et al., 2002). Dei secondi, ad oggi si conosce molto poco riguardo al loro ruolo, anche se è noto che *TM8* è espresso nello sviluppo e nelle prime fasi della maturazione nei frutti di pomodoro (Hileman et al., 2006).

Scopo del lavoro

Inoltre, sempre con lo scopo di avanzare un confronto tra i “frutti” di tasso e di ginkgo con i frutti delle Angiosperme, ho studiato a livello molecolare alcuni aspetti specifici del processo di maturazione. In particolare, utilizzando la tecnica della RT-PCR, ho clonato frammenti di cDNA codificanti per enzimi coinvolti nei processi di:

- Rammollimento
- Cambiamento di colore
- Sintesi e percezione di etilene

Di questi geni ho studiato l'espressione in vari tessuti e nei “frutti” a diversi stadi di sviluppo e maturazione per cercare di capire il loro possibile coinvolgimento nel processo fisiologico menzionato sopra. Infine, poiché gli arilli di tasso producono etilene nelle ultime fasi della maturazione, ho condotto esperimenti con etilene esogeno per cercare di capire se essi siano confrontabili con i frutti climaterici delle piante a fiore.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Soluzioni comuni

Tampone di estrazione CTAB:	2% CTAB; 2% polivinilpirrolidone K30; 100 mM Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl; 0,5 g/L spermidina; 2% β -mercaptoetanolo (aggiunto fresco poco prima dell'uso).
Terreno LB agar:	10 g/L NaCl; 5 g/L estratto di lievito; 10 g/L peptone; 15 g/L agar; a pH 7 con NaOH (trattamento in autoclave).
Brodo SOC:	20 g/L peptone; 5 g/L estratto di lievito; 0,5 g/L NaCl (10 mM); 0,19 g/L KCl (10 mM); 0,95 g/L MgCl ₂ (10 mM); 1,2 g/L MgSO ₄ (10 mM); 3,6 g/L glucosio (20 mM).
TAE 1X:	Tris-acetato 40mM; 1 mM EDTA; pH 8.

3.2 Materiale vegetale

Per questo lavoro sono stati utilizzati dei tessuti di *Ginkgo biloba* e di *Taxus baccata* provenienti da piante presenti nell'Orto Botanico di Padova. Per quanto riguarda il ginkgo sono stati prelevati campioni di:

1. foglie;
2. stami (amenti maschili);
3. ovuli totali a vari stadi di sviluppo;
4. endosperma primario, comprensivo di embrione, di età crescente;
5. sarcotesta carnoso degli stessi semi di cui al punto 4.

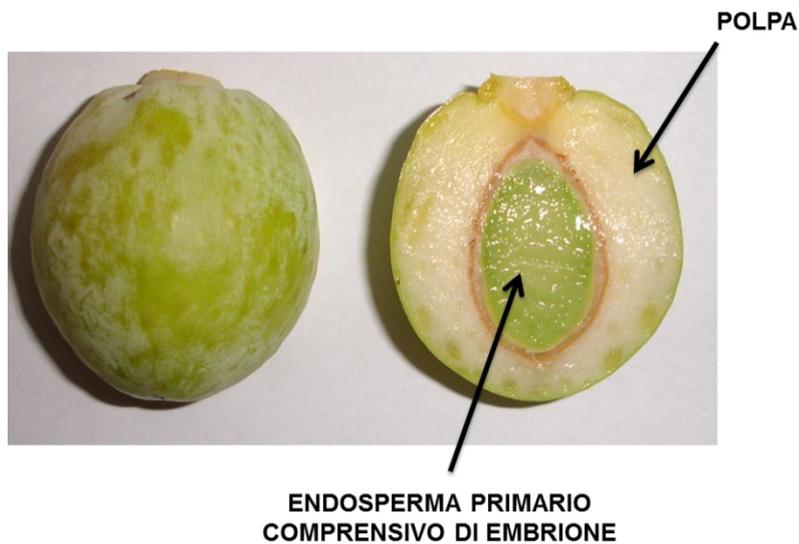


Figura 17: Sezione di un seme di *Ginkgo biloba*.

Invece per il tasso sono stati prelevati:

1. foglie;
2. strobili maschili;
3. ovuli;
4. seme;
5. arillo a diversi stadi di sviluppo.



Figura 18: Stadi di sviluppo dell'arillo di *Taxus baccata* di cui al punto 5: arillo verde (A), arillo verde carnoso (B), breaker 1 (C), breaker 2 (D) e arillo rosso (E).

Durante la fase di campionamento si è cercato di danneggiare il meno possibile i vari tessuti avendo cura di congelarli in azoto liquido, subito dopo averli recisi dal ramo.

3.3 ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

3.3.1 Estrazione di RNA totale

Per l'estrazione di RNA dai tessuti di *Taxus baccata* e *Ginkgo biloba* si è utilizzato il protocollo di Chang et al. (1993) modificato per ottimizzare la resa. La vetreria viene posta in stufa a 250°C per 4 ore e le soluzioni sono trattate con 0,1% DEPC (diethylpirocarbonato) e autoclavate. Si pesano 2 g di campione che vengono velocemente macinati in un mortaio precedentemente raffreddato con azoto liquido. Durante questa operazione bisogna prestare particolare attenzione a non scongelare il tessuto e a macinarlo il più finemente possibile.

Il tutto viene poi trasferito in una provetta falcon da 50 mL contenente 20 mL di tampone di estrazione CTAB preriscaldato a 65°C. Dopo aver agitato vigorosamente si aggiungono 20 mL di cloroformio-isoamilalcol 24:1 (v/v), si mescola per 20 minuti e quindi si centrifuga a 4000 x g per 20 minuti. Si preleva il surnatante e si effettua nuovamente l'estrazione con cloroformio-isoamilalcol. Tale operazione viene ripetuta per altre due volte. Si recupera poi in tubi puliti il surnatante, contenente gli acidi nucleici e si precipita l'RNA aggiungendo 1/3 di volume di LiCl 8 M, così da ottenere una soluzione 2 M. Si mescola per inversione e si lascia precipitare in ghiaccio per tutta la notte. Questo trattamento

permette la precipitazione selettiva dell'RNA, così che DNA, residui di zuccheri e fenoli rimangano in soluzione.

Il giorno successivo le provette falcon vengono centrifugate a 4000 x g per 80 minuti a 4°C. Si rimuove il surnatante e si lava il pellet, che contiene l'RNA, con 5 mL di etanolo 80% freddo. Si centrifuga per 10 minuti a 4000 x g. Si rimuove nuovamente il surnatante e si lascia asciugare il pellet. Quest'ultimo viene risospeso in un volume opportuno di H₂O mQ DEPC.

3.3.2 Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico viene estratto da foglie seguendo il protocollo di Fulton et al. (1995) per piccole preparazioni di DNA genomico. A 50-100 mg di foglie vengono aggiunti 250 µL di tampone di estrazione completo, preparato appena prima dell'uso e costituito da 1 vol. di tampone di estrazione di DNA (sorbitolo 0,35 M, Tris-base 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 8), 1 vol. di tampone di lisi dei nuclei [Tris 0,2 M, EDTA 0,05 M, NaCl 2M, CTAB (Cetil Trimetil Ammonio Bromuro) 2%], 0,4 vol. di sarcosile 5% p/v e 3-5 mg/ml di sodio bisolfito. Dopo aver macinato le foglie in una eppendorf con un apposito micropestello si aggiungono ancora 500 µL di tampone di estrazione completo e si incubano i campioni a 65°C per almeno 30 minuti. I tubi, una volta raffreddati, vengono riempiti con 750 µL di cloroformio: isoamilalcol (24:1) e centrifugati a 16000 x g per 5 minuti. Il DNA contenuto nella fase acquosa viene precipitato con un volume uguale di isopropanolo, recuperato centrifugando a 16000 x g per 5 min, lavato con etanolo 70% e infine risospeso in 50-100 µL di Tris-HCl contenente RNasi A (5 µg/mL).

3.4 Determinazione della concentrazione degli acidi nucleici

Per la quantificazione degli acidi nucleici si utilizza uno spettrofotometro Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 11 programmato per la lettura a quattro diverse lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm. La lettura viene effettuata in una cuvetta di quarzo utilizzando H₂O mQ, che rappresenta il "bianco".

La concentrazione espressa in ng/µL, viene calcolata:

$$[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} * 40 * \text{fattore di diluizione}$$

$$[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} * 50 * \text{fattore di diluizione}$$

Ovviamente questo valore rappresenta una stima poiché non si è in grado di distinguere, in base all'assorbanza, l'RNA dal DNA. Le proteine presentano un picco di assorbimento a 280 nm, mentre gli zuccheri a 230 nm, perciò in base al rapporto di questi valori con quello OD_{260} è possibile determinare un indice di purezza del materiale. In particolare, se il rapporto $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ è maggiore di 1,8 il campione è considerato libero da contaminazioni proteiche; allo stesso modo il campione non presenta contaminazioni da zuccheri se il rapporto $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ è maggiore di 1,8. La quantificazione e l'integrità degli acidi nucleici estratti viene ulteriormente confermata mediante elettroforesi in gel di agarosio e opportuna colorazione con bromuro d'etidio. Per ogni campione vengono caricati 2 μg di acidi nucleici. La corsa elettroforetica avviene in tampone TAE 1X.

3.5 Purificazione dell'RNA dal DNA genomico

Durante le ultime fasi relative all'estrazione dell'RNA una piccola frazione di DNA genomico può precipitare. I campioni vengono quindi trattati con DNAsi, enzima in grado di degradare il DNA lasciando inalterato l'RNA. Per fare questo si aliquotano in un tubino:

- X ng di RNA estratto;
- 2 μL di RQ1 DNase Reaction Buffer 10X;
- 2 μL di RQ1 DNase free RNA;
- H_2O mQ DEPC fino ad un volume finale di 20 μL .

Le reazioni vengono effettuate con un termociclatore Applied Biosystems (GeneAmp, PCRSystem 9700) con il seguente ciclo:

- 40 min a 37°C;
- 10 min a 70°C;
- al termine il blocco si porta a 4°C.

3.6 Sintesi del cDNA: 3' race

La sintesi del cDNA consiste nella retrotrascrizione dell'RNA in un'elica complementare di DNA. Per fare questo, in un tubino si aliquotano 3 µg di RNA, 1µL di AP (adapter primer) e si porta a 12 µL con H₂O mQ DEPC. Successivamente si pone a 70°C per 5 minuti e poi in ghiaccio.

L'AP è disegnato in modo tale da avere una lunga coda di poly(T) finali che si va ad appaiare al poly(A) presente come sequenza terminale degli mRNA. Inoltre AP possiede una sequenza nota a valle del poly(T) che sarà inserita nel nuovo filamento di cDNA nascente, rendendo possibile l'appaiamento su questa regione di un primer reverse che, accoppiato con lo specifico primer forward, permetta di amplificare e quindi di isolare il messaggero del gene di interesse. In questo caso il primer reverse utilizzato è AUAP.

AP 5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
AUAP 5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'

A questo punto si prepara una mix da aliquotare nel tubino:

- 5X first strand buffer 4 µL
- 0,1 M DTT 2 µL
- RNase OUT (40U/µL) 1 µL
- dNTPs (10mM) 1 µL

Si mette a 42°C per 2 minuti, terminati i quali si aggiunge 1 µL di enzima SSRTIII (200 U/µL). La reazione di retrotrascrizione viene effettuata nel termociclatore Applied Biosystems (GeneAmp, PCRSystem 9700) con il seguente ciclo:

- 2 ore a 42°C;
- 10 min a 70°C.

A questo punto si esegue un trattamento con una RNAsi H, specifica per le molecole eteroduplex RNA:DNA, così da eliminare lo stampo iniziale di RNA. Si prepara una mix contenente:

Materiali e Metodi

- RNAsi H (5 U/ μ L) 0,2 μ L
- 10X RNAsi H buffer 0,2 μ L
- H₂O mQ 1,6 μ L

Questa soluzione viene aggiunta direttamente nei tubini all'interno del termoblocco, che viene portato alla temperatura di 37°C per 30 minuti. Infine il cDNA così ottenuto viene tenuto a 4°C e poi trasferito in eppendorf pulite e conservato a -20°C.

3.7 Sintesi del cDNA: 5' RACE

La sintesi del cDNA con il metodo 5' RACE permette l'isolamento e la caratterizzazione delle estremità 5' degli RNA messaggeri di interesse. Questo protocollo consiste nella sintesi del primo filamento di cDNA utilizzando un oligonucleotide specifico antisenso disegnato sulla sequenza del trascritto che si vuole completare. In questo modo si massimizza la sintesi dei cDNA di interesse, tralasciando tutti gli altri RNA messaggeri presenti. In un tubino si aliquotano:

- RNA totale 1 μ g
- Oligonucleotide specifico antisenso (10 μ M) 1 μ L
- H₂O DEPC fino a un volume di 15,5 μ L

Si mette a 70°C per 10 minuti in modo da denaturare l'RNA e poi si raffredda in ghiaccio per 1 minuto.

Dopo aver raffreddato, si aggiungono i seguenti reagenti:

- 5X first strand buffer 4 μ L
- 0,1 M DTT 2.5 μ L
- RNase OUT (40U/ μ L) 1 μ L
- dNTPs (10mM) 1 μ L

Si mette a 42°C per 2 minuti, terminati i quali si aggiunge 1 μ L di enzima SSRTIII (200 U/ μ L). La reazione di retrotrascrizione viene effettuata nel termociclatore Applied Biosystems (GeneAmp, PCRSystem 9700) con il seguente ciclo:

Materiali e Metodi

- 2 ore a 42°C;
- 10 min a 70°C.

Si procede poi alla purificazione del cDNA mediante opportune colonnine di purificazione (colonnine SNAP *Invitrogen*). Ai tubini si aggiungono 20 µL di sodio acetato 3 M pH 5.2 e 500 µL di Loading Buffer; si agita vigorosamente e si trasferisce il tutto nelle colonnine di eluizione. Si centrifuga a 16000 x g per un minuto a temperatura ambiente, poi si rimuove l'eluato. Si carica al centro della colonnina 700 µL di Wash Buffer, si centrifuga a 16000 x g per un minuto; si elimina l'eluato. Si effettua un secondo lavaggio, caricando nuovamente al centro della colonnina 700 µL di Wash Buffer, si centrifuga a 16000 x g per un minuto. Si trasferisce la colonnina in una nuova provetta e si eluisce con 60 µL di H₂O mQ calda, si centrifuga a 16000 x g per un minuto. L'eluato rappresenta il cDNA sintetizzato. Si concentra l'eluato a 10 µL con la Speed vac e poi si procede alla reazione con l'enzima TdT (terminal deossinucleotidil transferasi) in modo da aggiungere alle estremità 3' del cDNA una coda omopolimerica.

- cDNA 10 µL
- 5X Tailing buffer 5 µL
- 2mM dCTP 2,5 µL
- H₂O DEPC 6,5 µL

Si mette a 94°C per 2-3 minuti e in seguito si raffredda per 1 minuto in ghiaccio. Si aggiunge 1 µL di TdT (5U/ µL) e si mette a 37°C per 1 ora. Al termine si inattiva l'enzima mettendo 10 minuti a 65°C. A questo punto il cDNA è pronto e si può effettuare una PCR utilizzando un oligonucleotide specifico antisense progettato più a monte rispetto a quello utilizzato per la sintesi del cDNA e un oligonucleotide specifico in grado di legarsi alla coda aggiunta con la reazione catalizzata dalla TdT. Nel mio caso questo secondo oligonucleotide è chiamato Abridge Anchor Primer.

AbridgeAnchor Primer	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
----------------------	--

3.8 Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

Un potente metodo per amplificare particolari segmenti di DNA è rappresentato dalla PCR (polymerase chain reaction), che avviene *in vitro*.

Nel mio caso oltre alla classica reazione di PCR ho utilizzato un'implementazione di questa tecnica denominata PCR a gradiente, che consente di operare con temperature di annealing diverse nel corso della stessa reazione. Questa procedura permette di ottimizzare le temperature di lavoro degli oligonucleotidi così da farli reagire nel miglior modo possibile.

Un'altra applicazione della PCR usata è la touchdown PCR (TD-PCR), in altre parole una tecnica che permette di aumentare la specificità della reazione mantenendo molto alta la stringenza dell'appaiamento degli oligonucleotidi; in questo modo diminuisce la formazione di sequenze aspecifiche consentendo invece alla sequenza desiderata di predominare. I primi passaggi di una TD-PCR avvengono a temperature di annealing molto alte in modo che l'appaiamento degli oligonucleotidi con la sequenza sia altamente specifico mentre gli altri cicli di reazione avvengono a temperature più basse.

Avendo preso in considerazione diversi trascritti non è possibile generalizzare le condizioni di PCR utilizzate, quindi in questa sezione mi limito a fornire le caratteristiche generali dell'esperimento, mentre nella sezione allegati, si troveranno in dettaglio gli oligonucleotidi usati e le temperature di annealing che hanno permesso di ottenere il risultato.

- cDNA di interesse
- MgCl₂ (50mM) 1,5 µL
- oligo forward (200µM) 0,5 µL
- oligo reverse (200µM) 0,5 µL
- 10x Buffer 5,0 µL
- dNTPs (10mM) 0,5 µL
- Eurotaq (5u/µl) 0,2 µL
- H₂O mQ fino ad un volume finale di 50 µL.

L'esperimento è stato compiuto in un termociclatore Mastercycler Eppendorf S con il seguente ciclo:

- 2 min a 95°C;
 - 20 sec a 95°C;
 - 20 sec di annealing alle diverse temperature
 - X min a 72°C;
 - 2 min a 72°C;
 - al termine il blocco si porta a 20°C.
- } 40 cicli

Per controllare l'effettiva presenza dell'amplificato si esegue un'elettroforesi su gel con una percentuale di agarosio che varia a seconda delle dimensioni dell'amplificato che si prevede di ottenere.

3.9 Purificazione dei prodotti di PCR

Per la purificazione dei prodotti di PCR sono state usate delle colonnine *Millipore Microcon*. Il prodotto di PCR viene portato al volume finale di 100 μ L con H₂O mQ per poi essere trasferito in una colonnina la cui membrana viene preventivamente idratata con 400 μ L di H₂O mQ. Si centrifuga per 20 minuti a 14000 x g e a questo punto si aggiungono altri 500 μ L di H₂O mQ e si centrifuga per 20 minuti a 14000 x g. Si trasferisce infine la colonnina capovolta in una nuova eppendorf e si centrifuga per 5 minuti a 1000 x g: l'eluato che si ottiene è il prodotto di PCR purificato.

3.10 Purificazione da banda

Un altro metodo che è stato utilizzato per purificare i prodotti di PCR è la purificazione da banda. In questo caso viene tagliata la banda di interesse dal gel di agarosio e subito dopo purificata con un kit (*Ultrafree-DA Millipore*) che utilizza una colonnina dotata di un filtro che eluisce i frammenti di DNA ma trattiene l'agarosio. Questa strategia viene generalmente usata per purificare i prodotti di PCR dai dimeri di oligonucleotidi, quando questi ultimi sono presenti in quantità elevate e quindi renderebbero problematica la reazione di ligazione.

3.11 Reazione di ligazione

La reazione di ligazione ha come obiettivo l'inserimento di un frammento di DNA nel vettore di clonaggio pCR2.1-TOPO che presenta due T sporgenti nella regione del sito di policlونaggio (figura 19). Questo vettore possiede la sequenza di resistenza all'ampicillina, alla kanamicina e il gene reporter Lac-Z (in questo modo è possibile discriminare quando il vettore è vuoto da quando è presente l'inserto). L'inserimento del frammento di DNA da clonare, ottenuto dalla purificazione dei prodotti di PCR, avviene attraverso la seguente reazione di ligazione:

- Insetto 3 μ L
- Salt Solution (dil. 1:4) 1 μ L
- Vettore 1 μ L
- H₂O mQ 1 μ L

La reazione avviene a temperatura ambiente (22 °C) per 20 minuti.

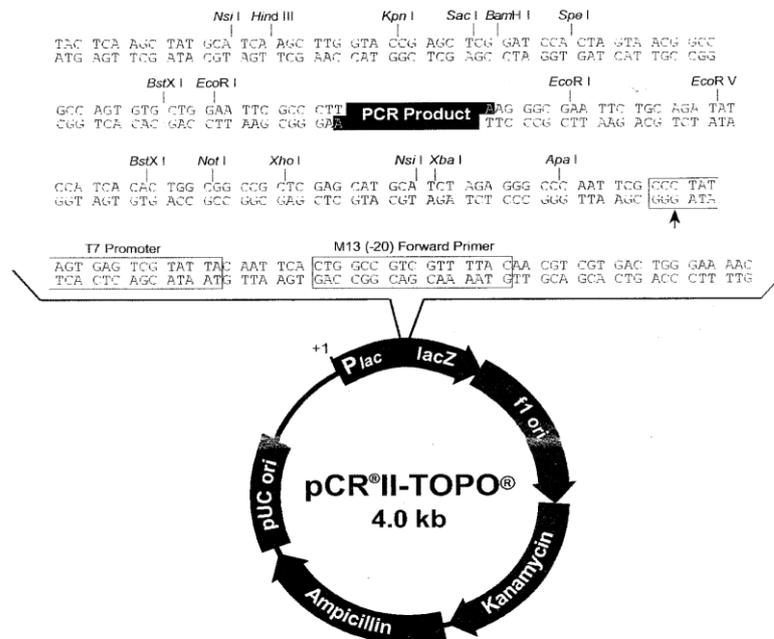


Figura 19: Rappresentazione schematica del vettore pCR®II-Topo® (Invitrogen).

3.12 Trasformazione di *Escherichia coli* mediante elettroporazione

Alla fine della reazione di ligazione si trasformano cellule di *E. coli* DH10B, mediante elettroporazione. Per riuscire a discriminare tra cellule veramente trasformate e cellule non trasformate, i batteri vengono piastrati su un terreno selettivo composto da:

- terreno LB agar;
- antibiotico ampicillina (100 mg/mL);
- antibiotico kanamicina (50 mg/mL);
- 35 μ L di induttore IPTG (100 mM);
- 16 μ L di substrato x-gal (50 mg/mL);
- SOC.

Successivamente vengono lasciate a 37°C per tutta la notte.

Le cellule che hanno incorporato il plasmide cresceranno nel terreno contenente gli antibiotici, nei confronti dei quali sono resistenti. Queste cellule trasformate verranno riconosciute mediante l'aggiunta di x-gal, un substrato incolore della β -galattosidasi. Tale enzima converte il substrato in un composto blu, che colora l'intera colonia. Se il prodotto di PCR si è inserito nel plasmide, la β -galattosidasi non verrà sintetizzata, la molecola x-gal non sarà metabolizzata e quindi la colonia risulterà bianca.

Individuate le colonie delle cellule trasformate, queste possono essere isolate e coltivate in un terreno liquido adatto per farle replicare.

3.13 Amplificazione dei cloni batterici

Per amplificare i cloni batterici trasformati, si scelgono dalle piastre le colonie bianche più isolate e con un puntale si striscia leggermente in modo da prelevarne una parte. Si immerge poi il puntale in tubini contenenti ciascuno 150 μ L il terreno di coltura LB e l'antibiotico (50 mg/mL kanamicina) e si lasciano a 37°C per 2 ore. Al termine dell'incubazione i cloni batterici vengono amplificati con una PCR da colonia preparando una mix contenente per ogni campione:

Materiali e Metodi

oligo M13FOR (10 μ M)	0,7 μ L
oligo M13REV (10 μ M)	0,7 μ L
10X Buffer	5 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 μ L
dNTPs (10 mM)	1 μ L
Euro Taq (5 u/ μ L)	0,2 μ L
H ₂ O mQ	39,9 μ L

La reazione viene effettuata nel termociclatore Applied Biosystems (GeneAmp, PCR System 9700) con il seguente ciclo:

1. 5 min a 95°C;
 2. 30 sec a 95°C;
 3. 30 sec a 55°C;
 4. X min a 72°C;
 5. 2 min a 72°C;
 6. al termine il blocco si porta a 20°C.
- } 40 cicli

La X indica il tempo necessario per amplificare il frammento voluto e quindi dipende di volta in volta da quale amplificato si deve analizzare.

Per verificare l'effettiva presenza dell'amplificato si esegue un'elettroforesi dei prodotti di PCR su gel di agarosio. Nel caso si riscontri la presenza di bande di dimensione prevista, si purificano i prodotti di PCR e si procede con il sequenziamento, oppure si recuperano i batteri e si prepara un inoculo di 3 mL di LB con kanamicina 50 mg/mL e si lasciano a crescere a 37°C tutta la notte per poi preparare il DNA plasmidico.

3.14 Preparazione di DNA plasmidico

Per estrarre il DNA plasmidico da cloni batterici (miniprep) si prelevano 1,5 mL di inoculo e si centrifuga per 2 minuti a 16.000 x g; dopo aver eliminato il surnatante, i batteri precipitati vengono trattati con tre diverse soluzioni:

- 200 μ L di soluzione di risospensione P1 (100 μ g/mL RNAsi A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8);
- 200 μ L di soluzione di lisi P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS, pH 8);

Materiali e Metodi

- 200 μL di soluzione di neutralizzazione P3 (3 M potassio acetato, pH 5,5) fredda.

Centrifugando poi il campione alla massima velocità per 5 minuti a 4°C , precipitano tutte le impurezze e rimane in soluzione il DNA plasmidico che può essere recuperato e conservato a -20°C .

Il campione può anche essere purificato con fenolo-cloroformio in modo tale da eliminare le proteine presenti che, essendo ricche di amminoacidi idrofobici, saranno più solubili in sostanze organiche, mentre gli acidi nucleici potranno essere recuperati dalla fase acquosa. Si aggiunge quindi al campione un ugual volume di una miscela di fenolo e cloroformio-isoamilalcol 25:24:1 (v:v:v). La fase acquosa che si ottiene viene poi estratta con un ugual volume di cloroformio-isoamilalcol 24:1 (v:v). Il DNA viene successivamente precipitato con 2,5 volumi di etanolo assoluto, lasciando a -80°C per 15 minuti e centrifugando a $16.000 \times g$ a 4°C per 15 minuti. Segue poi un lavaggio del pellet con 1 mL di etanolo 70% e una centrifugazione a $16.000 \times g$ a 4°C per 5 minuti. Il DNA plasmidico viene infine portato a secco e risospeso in 50 μL di H_2O mQ.

Generalmente, per verificare che il DNA plasmidico appena preparato contenga l'inserito corretto (inserito nel vettore durante la reazione di ligazione) si esegue una reazione di restrizione con l'enzima EcoRI (la digestione libera l'eventuale inserito, vedi Fig. 19). La mix che viene preparata è la seguente:

- DNA plasmidico 3 μL
- Eco RI (20 U/ μL) 0,5 μL
- 10X Eco RI buffer 1 μL
- H_2O mQ 5,5 μL

La digestione viene condotta per 1 ora a 37°C .

Successivamente si esegue un'elettroforesi su gel di agarosio della miniprep appena digerita.

3.15 Sequenziamento

Le sequenze di DNA sono state ottenute mediante sequenziamento automatico con Abi Prism 377 DNA Sequencer (PE, Applied Biosystem, USA), eseguito presso il BMR Genomics (Padova), secondo quanto descritto nel sito www.bmr-genomics.it. Le sequenze ottenute sono state analizzate con il pacchetto di programmi Lasergene (DNASTAR Inc., USA).

3.16 Progettazione di oligonucleotidi

Siccome la maggior parte dei geni presi in considerazione non erano noti in letteratura ho dovuto isolarli attraverso l'utilizzo di PCR con oligonucleotidi degenerati. Questi oligonucleotidi sono stati disegnati sulle regioni più conservate dell'allineamento ottenuto dalle sequenze note sia di Gimnosperme sia di Angiosperme di ogni gene considerato, presenti in rete. Sono stati disegnati seguendo le regole della degenerazione del codice genetico. La coppia di oligonucleotidi che ha dato il risultato migliore è riportata nella sezione allegati.

Sia gli oligonucleotidi necessari a sequenziare interamente il gene d'interesse sia quelli disegnati per le analisi di espressione mediante la tecnica di Real time PCR, sono stati progettati con il programma Primer Select (Lasergene, DNASTAR INC., USA). Tali primers sono stati disegnati sui frammenti di cDNA ottenuti dopo il sequenziamento delle sequenze clonate mediante l'utilizzo degli oligonucleotidi degenerati.

3.17 Trattamenti con etilene

I trattamenti con etilene sono stati eseguiti ponendo alcuni rametti di tasso, portanti alcuni arilli, in un recipiente con acqua e incubando il tutto per 12 e 24 ore in una camera ermetica in cui viene fatto circolare un flusso costante di aria contenente 10 ppm di etilene. In seguito questi sono stati tolti e messi all'aria per altre 12 e 24 ore. Contemporaneamente si è tenuto un controllo all'aria per 24 e 48 ore. Al termine del trattamento gli arilli sono stati campionati in azoto liquido e conservati a -80°C .

3.18 Real time PCR

Per valutare il livello di espressione dei geni in analisi vengono effettuati degli esperimenti di Real Time PCR, una metodologia che permette la rilevazione dell'abbondanza di trascritti. Questo è possibile mediante un monitoraggio in tempo reale dei prodotti di amplificazione.

La reazione di amplificazione raggiunge una fase esponenziale durante la quale è possibile determinare un segnale di fluorescenza soglia (*threshold*) con cui tutti i campioni possono essere confrontati. Il valore soglia viene calcolato in funzione del background di fluorescenza e corrisponde al punto nel quale il segnale generato dal campione è significativo, cioè più alto rispetto al segnale di fondo.

Il numero di cicli di PCR, richiesto per generare un segnale significativo, è definito come ciclo soglia o Ct. Il valore di Ct è in relazione alla quantità di trascritto di partenza e consente di calcolare l'abbondanza di un particolare mRNA nel campione in esame. Trascritti più abbondanti nel campione iniziale saranno rilevati più precocemente durante la reazione di PCR rispetto ai trascritti più rari e verranno quindi associati a Ct più bassi.

Il software effettua in automatico una prima elaborazione dei dati: dall'intensità rilevata del segnale di fluorescenza viene sottratto il rumore di fondo (baseline) e tale valore viene utilizzato per il calcolo della fluorescenza normalizzata rispetto ad un riferimento passivo interno che contiene il colorante Rox. Quindi per ogni reazione effettuata il software elabora una curva sigmoide, definita "plot di amplificazione". La curva di dissociazione invece permette di ottenere informazioni sulla dissociazione degli ampliconi di una corsa PCR quantitativa. In ascissa viene riportata la temperatura e in ordinata le variazioni di fluorescenza.

La curva di dissociazione viene utilizzata per indagare sulla presenza di prodotti aspecifici di amplificazione. Se viene utilizzata una sola coppia di oligonucleotidi, la curva di dissociazione deve mostrare un solo picco in corrispondenza dell'unico amplicone specifico. La presenza di più picchi individua un amplicone aspecifico dovuto, ad esempio, alla presenza di DNA genomico oppure a dimeri di oligonucleotidi che hanno una temperatura di dissociazione caratteristica più bassa del prodotto specifico.

Con la Real time PCR, i prodotti di amplificazione vengono monitorati grazie alla misura dell'incremento della fluorescenza causata dal legame di un intercalante al DNA, il Syber Green. Questo fluoroforo è semplice da utilizzare, è adattabile a tutti i protocolli di PCR e qRT-PCR in quanto indipendente dalla sequenza,

Materiali e Metodi

presenta un'elevata sensibilità ed è molto economico. Presenta però alcuni svantaggi poiché si lega ai dimeri di oligonucleotidi e ai prodotti di amplificazione aspecifici, non essendo un metodo sequenza specifico; tuttavia l'analisi della curva di melting può in parte risolvere questo problema. Il cDNA da usare come stampo viene preparato con il kit "High Capacity cDNA Archive Kit" (Applied Biosystem), partendo da 6 µg di RNA totale privo di contaminazioni da DNA (opportunamente trattato con DNAsi). Si è utilizzato il termociclatore Applied Biosystems (GeneAmp, PCRSystem 9700) con il seguente ciclo:

- 10 min a 25°C;
- 2 ore a 37°C.

Le reazioni vengono effettuate preparando la seguente mix di reazione:

- | | |
|--|---------|
| • cDNA | 5 µL |
| • "Syber Green PCR master mix" (Applied Biosystem) | 12,5 µL |
| • mix oligonucleotidi forward e reverse (5 µM) | 1 µL |
| • H ₂ O mQ | 6,5 µL |

La mix viene aliquotata in una piastra da 96 pozzetti che viene poi inserita nello strumento "7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystem).

Le condizioni di PCR impostate sono:

- | | |
|----------------------------------|------------|
| • 2 min a 50°C; | |
| • 10 min a 95°C; | |
| • 15 sec a 95°C (denaturazione); | } 40 cicli |
| • 15 sec a 60°C (annealing); | |
| • 34 sec a 65°C (estensione); | |
| • 1 min a 72°C | |

Al termine della PCR viene effettuata una curva di dissociazione a partire da 60°C. I valori di Ct, come media di tre repliche calcolate e normalizzate indipendentemente, vengono analizzati con il software "Q-gene". Il Ct è dipendente dal numero di copie iniziali di RNA stampo ed è tanto più alto quanto minore è la concentrazione iniziale di template.

Come controlli endogeni vengono scelti i geni "housekeeping", i quali sono presenti in tutte le cellule perché indispensabili per la loro sopravvivenza. Recentemente è stata avanzata l'ipotesi che non esistano geni "housekeeping" in senso assoluto, per questo è importante assicurarsi che i livelli di espressione della molecola di riferimento rimangano costanti almeno nelle condizioni sperimentali in esame. Nel nostro caso, abbiamo utilizzato le regioni spaziatrici dei geni ribosomali 26S (ITS). Gli oligonucleotidi utilizzati per le analisi di espressione sono riportati nella tabella 1 sottostante.

NOME OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENZA 5'- 3'	UTILIZZO
its_Tb_rev	CGTGGGGGAAAATCGGAGAAA	Normalizzatori per il tasso
its_Tb_for	AAGTGTCGCCGGGCAGGTAATG	
ITS_ginkgo_for	GCGGTCGGGAAGGATGTGC	Normalizzatori per il ginkgo
ITS_ginkgo_rev	GCCGAGGGGAAAATGCGAGAAG	
GBM1_realtime_for	TCGGAAAAAGGAAAGGCTGCTAC	Ginkgo: profilo di espressione di GBM1
GBM1_realtime_rev	GGGTTCCAAGGTCCATTATCGTC	
GBM8_realtime_for	TAAACAAGTCCCTGCGCAAGAAGC	Ginkgo: profilo di espressione di GBM8
GBM8_realtime_rev	ATCTGTAAAGTGGGCTCGCAATCC	
Tb_agl6real_FOR	ATTGCAAGAGTCGACTGCCTCAGA	Tasso: profilo di espressione di AGL6
Tb_agl6real_REV	GTCCAAGATCTTCCCCTAATAAACG	
TbTM8_realfor	TAGCCTAAATCTCAGCCTCTCGTG	Tasso: profilo di espressione di TM8
TbTM8_realrev	TCTTGAAC TTGTGCTCTGATGTGG	
GbMADS6_realfor	CAACGGTTCCTGCAAGATGAGA	Ginkgo: profilo di espressione di GbMADS6
GbMADS6_realrev	AGGTGCAGGCTTGTATGATGGAGT	
GbMADS7_realfor	TTGGGCGACAGATAAGAGTTGGTT	Ginkgo: profilo di espressione di GbMADS7
GbMADS7_realrev	TGATGGAAGATTCCGGTGGTCGTA	
GbMADS11_realfor	AAGATGGCCATGTGTACCTCAAC	Ginkgo: profilo di espressione di GbMADS11
GbMADS11_realrev	AGCCTGCACAACCACTTACTCCAT	
Tb_PL_real_for	CGGGTAACGCGATGGTGAGA	Tasso: profilo di espressione della pectato liasi
Tb_PL_real_rev	TTGGAATGGTAATGGCAGTGGAT	
PL_Gb for	GCTGTGCTGATGGCCTGATTGA	Ginkgo: profilo di espressione della pectato liasi
PL_Gb rev	ACCAAGCCCTCCCCAAAGTG	
Gb_exp_realfor	TCCAACAATGCTCTACCCAACAA	Ginkgo: profilo di espressione dell'espansina
Gb_exp_realrev	GATTCCTCCCTTCTCTCACACG	
Tb_expA_real_for	GGGCACTCTTTGGTACATAACAGG	Tasso: profilo di espressione dell'espansina A
Tb_expA_real_rev	GCCCACCAACAACGCACTTC	
Tb_expB_real_for	GTTGCACCATCCTCCGTTGTCGT	Tasso: profilo di espressione dell'espansina B
Tb_expB_real_rev	CCTGCGGAGCCTGTTATGAAATGA	
tb_betagal_realfor	GAGACACATCTTGACCCCGTGGAT	Tasso: profilo di espressione della betagalattosidasi
tb_betagal_realrev	TGGATGAGATGACTTGCCAGATG	

Tb_PME_real_for	CGCCCGTAAACCCTTAGAAAACC	Tasso: profilo di espressione della pectimetilesterasi
Tb_PME_real_rev	CACGGCCTGCCCAGATAAACCTT	
Gb_CHS_realfor	GCAAAGGATCTCGCCGAAAACAAC	Ginkgo: profilo di espressione della calcione sintasi
Gb_CHS_realrev	AGCCGCTGCCCGTCTCC	
Tb_CHS_realFOR	GGCGCAGACTACCAACTCACTAAA	Tasso: profilo di espressione della calcione sintasi
Tb_CHS_realREV	ACTCTGGCTCCGCGGTTGTTCTC	
Gb_PSY_realfor	AGCTGGGACAGTAGGATTGATGAG	Ginkgo: profilo di espressione della fitoene sintasi
Gb_PSY_realrev	AAAGCTAAGGCAGCACCGTAAAC	
Tb_PSY_realfor	GCGCAATACCCATTACAGGAACA	Tasso: profilo di espressione della fitoene sintasi
Tb_PSY_realrev	GCCATTTAGGGGTATGATTGAGG	
GbSAM_real_for	GTTGAGGCCTGATGGGAAGACC	Ginkgo: profilo di espressione della SAM sintetasi
GbSAM_realrev	CACAGGCTTGATCACATGCTCCTT	
TbSAM_realfor	AATGGTACTTGCCCCTGGTTGAGG	Tasso: profilo di espressione della SAM sintetasi
TbSAM_realrev	GCAGCAATCTGGTCGTTGGTGACA	
GbACO_realfor	GGAGGTGTACAAATTGGCAGAGAA	Ginkgo: profilo di espressione della ACC ossidasi
GbACO_realrev	GCACGGTGGATAATGGCTAACTTT	
Tb_ACO_real_for	GAGGTTCCGGGGCTTCAGGT	Tasso: profilo di espressione della ACC ossidasi
Tb_ACO_real_rev	GATGCCACGCGCTCTTGTATTTTC	
tb_etr_realfor	TTTTTCGTCACCAACAGCATACCC	Tasso: profilo di espressione di ETR
tb_etr_realrev	GACGGAAGCCTGGAACCTCAACATT	

Tabella 1: Elenco degli oligonucleotidi utilizzati per le analisi di espressione.

3.19 Analisi filogenetica

Le analisi filogenetiche sono state condotte prendendo in considerazione le sequenze dei geni MADS-box prelevati dal database Genebank. Le sequenze sono state allineate usando il programma ClustalW prendendo in considerazione per ognuna i domini M, I, K (circa i primi 150 aa). L'allineamento è stato ottimizzato usando il programma Gblocks presente nel sito www.phylogeny.fr. Gli allineamenti così ottenuti sono stati utilizzati per la costruzione degli alberi filogenetici secondo l'algoritmo Neighbor Joining (Saitou et al., 1987) presente nel pacchetto bioinformatico MEGA 4.0.2. I valori di bootstrap indicati sono stati ottenuti facendo 1000 repliche. Nella tabella 2 sono riportate le sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica.

NOME SEQUENZA	Numero di accesso (Genbank)
<i>Arabidopsis thaliana</i> AG	AT4G18960
<i>Arabidopsis thaliana</i> AGL6	NM_130127
<i>Arabidopsis thaliana</i> AGL13	NM_115976
<i>Arabidopsis thaliana</i> SEP1	NM_001125758
<i>Arabidopsis thaliana</i> AGL9/SEP3	NM_180622
<i>Arabidopsis thaliana</i> AGL4/SEP2	NM_111098
<i>Pinus radiata</i> PrMADS2	PRU42400
<i>Ginkgo biloba</i> GbMADS8	AB029470
<i>Ginkgo biloba</i> GbMADS1	AB029463
<i>Antirrhinum majus</i> GLO	AB516403
<i>Antirrhinum majus</i> DEF	AB516402
<i>Arabidopsis thaliana</i> AGL3/SEP4	NM_201682
<i>Pinus radiata</i> PrMADS3	U76726
<i>Arabidopsis thaliana</i> PI	NM_122031
<i>Picea abies</i> DAL13	AF158544
<i>Chara globularis</i> CgMADS1	AB035567
<i>Gnetum parvifolium</i> GpMADS3	AB022665
<i>Zea mays</i> AG	NM_001112476
<i>Ginkgo biloba</i> AG	AY114304
<i>Cycas edentata</i> AG	AY295079
<i>Gnetum gnemon</i> GGM9	AJ132215
<i>Gnetum gnemon</i> GGM11	AJ132217
<i>Cryptomeria japonica</i> 14P13	AB359029
<i>Cryptomeria japonica</i> M09_TM8	AB359027
<i>Cryptomeria japonica</i> O23_TM8	AB359028
<i>Ginkgo biloba</i> GbMADS6	AB029468
<i>Ginkgo biloba</i> GbMADS7	AB029469
<i>Vitis vinifera</i> TM8	XM_002283880
<i>Lycopersicon esculentum</i> LeTM8	X60760
<i>Cucumis sativus</i> ERAF17	AB046596
<i>Picea abies</i> dal2	X79280
<i>Ginkgo biloba</i> GbMADS11	AB029473

Tabella 2: Elenco delle sequenze prese in esame per l'analisi filogenetica con il relativo numero di accesso al database Genebank.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 STUDIO DELLO SVILUPPO

Molto importante per questo studio sono i geni il cui ruolo si esplica nelle fasi iniziali della via di sviluppo che porta alla formazione di un frutto carnoso e, a questo proposito, i geni MADS-box sono fra i candidati più significativi. Ad esempio, un gene MADS-box di classe C di pesco, se espresso costitutivamente in pomodoro, era in grado di modificare lo sviluppo dei sepali, normalmente fogliacei, inducendoli a diventare strutture simili a frutti carnosi ectopici (Tadiello et al., 2009). Inoltre, dalla letteratura i geni MADS-box sono noti per essere specificatamente espressi negli apparati riproduttivi femminili delle Gimnosperme, e quindi con molta probabilità coinvolti anche nello sviluppo delle polpe. A questo proposito gli unici dati molecolari noti, sulle specie studiate in questo lavoro, indicavano come un gene di tipo *AGAMOUS* fosse presente nelle strutture carnose sia di ginkgo che di tasso (Lovisetto, 2007). Per questo motivo, nel corso di questi tre anni ho deciso di concentrarmi su altri geni di tipo MADS-box e mi sono dedicato a quelli appartenenti al gruppo degli *AGL6* e al gruppo dei *TM8*.

4.1.1 GENI DI TIPO *AGL6*

Come già accennato nell'introduzione, i geni appartenenti al gruppo degli *AGL6* sono interessanti perché sono molto vicini ai geni MADS-box di tipo *SEPALLATA*, dei quali ne è un esempio *LeMADS-RIN*. Non essendo i geni *SEPALLATA* presenti nelle Gimnosperme, ho deciso di rivolgere la mia attenzione agli *AGL6* che sono presenti negli apparati riproduttori femminili (Carlsbecker et al., 2004; Mouradov et al., 1998; Winter et al., 1999).

A proposito di questo gruppo di geni MADS-box nulla era noto circa la loro presenza sia in ginkgo sia in tasso. Per quanto riguarda ginkgo ho sfruttato la presenza in rete di numerose sequenze di geni MADS-box non ancora caratterizzate. Utilizzando le sequenze degli *AGL6* noti di Gimnosperme ho condotto degli allineamenti utilizzando il programma BLASTN sul database

Genebank. I risultati ottenuti hanno mostrato un alto livello di similarità con due sequenze denominate: *GbMADS1* (numero di accesso AB029463) e *GbMADS8* (numero di accesso AB029470), due sequenze che tra di loro dimostravano una percentuale di similarità nucleotidica del 68% e una percentuale di similarità aminoacidica di circa il 72%. Il fatto che l'analisi BLASTN abbia individuato due sequenze con un alto livello di similarità con gli altri AGL6 noti di Gimnosperma non è di per sé strano poiché in diverse specie sono stati isolati due gruppi paraloghi di AGL6, di cui uno espresso soprattutto nelle parti riproduttive femminili e l'altro espresso anche nelle parti vegetative (ad esempio *Gnetum gnemon*, *Pinus radiata*, ecc) (Winter et al., 1999; Mouradov et al., 1998).

Per quanto riguarda tasso non erano presenti nei database pubblici sequenze di geni MADS-box e quindi ho dovuto cercare di isolarli io stesso. Il lavoro è iniziato scaricando dalla rete tutte le sequenze note di AGL6 nelle Gimnosperme e, dopo averle allineate, sono state disegnate varie coppie di oligonucleotidi degenerati sulle regioni più conservate e quindi all'altezza dei domini M e K. In questo modo sono riuscito ad avere un frammento del cDNA che si è rivelato essere appartenente al gruppo degli AGL6. Per completarne la sequenza (allegato 6.1) ho utilizzato i metodi della 3' RACE e 5' RACE come spiegato nella sezione materiali e metodi.

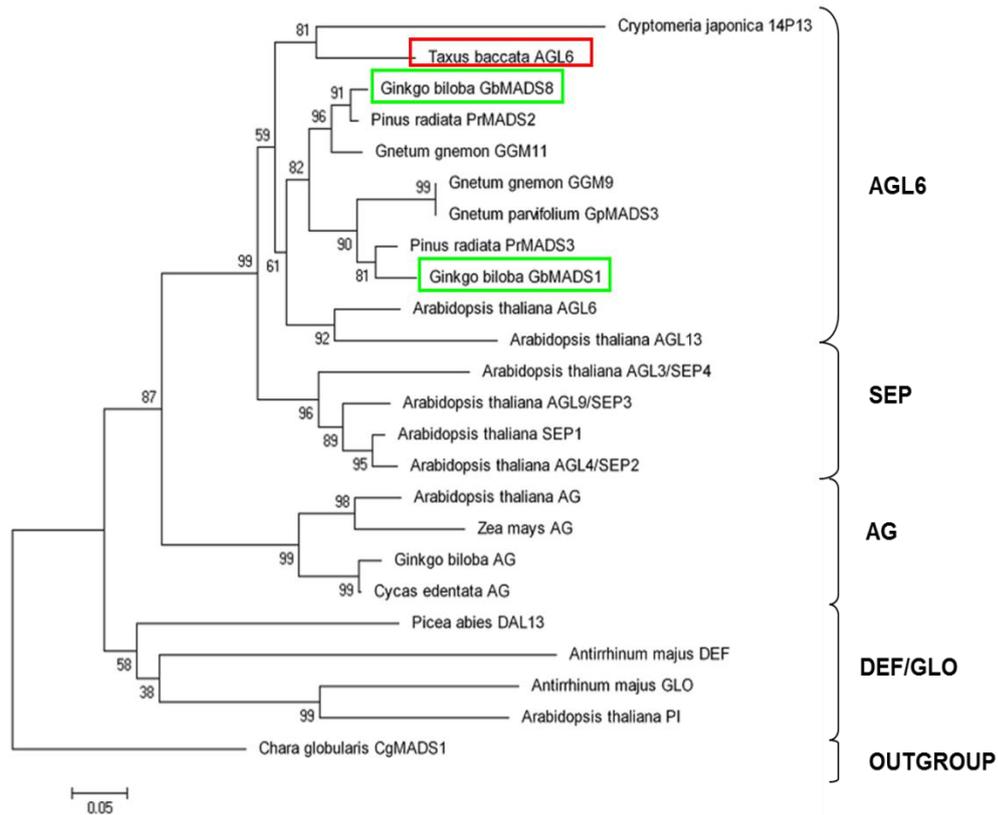


Figura 20: Albero filogenetico che mostra le relazioni tra alcune sequenze di geni MADS-box di Gimnosperme e di Angiosperme.

Dalla figura 20 si può vedere come tutti gli *AGL6* facciano parte dello stesso clade. All'interno di esso gli *AGL6* di *Arabidopsis* risultano separati da quelli delle Gimnosperme. Fra questi ultimi si può osservare come *AGL6* di tasso formi un clade con uno di *Cryptomeria*, con la quale ha una percentuale di similarità aminoacidica del 66%. Nel caso del ginkgo si può notare come i due *AGL6* stiano ciascuno su un clade distinto assieme ad un altro *AGL6* di *Pinus radiata*.

Come già descritto in precedenza, in molte specie vi è la presenza di una coppia di geni appartenenti al gruppo degli *AGL6* (*Arabidopsis thaliana*, *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Ginkgo biloba*, *Gnetum gnemon*, ecc.) ma, nel mio caso, non sono riuscito a isolare un eventuale secondo gene in tasso nonostante gli innumerevoli tentativi di amplificazione sia da cDNA che da DNA genomico. A tal proposito bisogna precisare che la situazione di questo gruppo di geni non è costante in ogni specie. Ad esempio nella già citata *Cryptomeria japonica* (Futamura et al.,

2008) e in *Welwitschia mirabilis* (Soltis et al., 2007), una Gimnosperma appartenente al gruppo delle *Gnetales*, è presente un solo *AGL6* mentre in *Zamia fischeri*, una specie appartenente al gruppo delle *Cycadales*, ce ne sono ben tre (Soltis et al., 2007). Pertanto, il mancato isolamento di un secondo *AGL6* di tasso potrebbe anche indicare che in questa specie è presente un solo gene di tipo *AGL6*, anche se non si può escludere che le metodologie e le condizioni che ho utilizzato non siano state adeguate per il suo isolamento.

Per cercare di capire se questi geni MADS-box di tipo *AGL6* fossero coinvolti anche nella formazione e successivo sviluppo dei “frutti” di ginkgo e di tasso ho eseguito una serie di esperimenti di espressione con la Real time PCR con particolare attenzione rivolta agli stadi di sviluppo delle polpe.

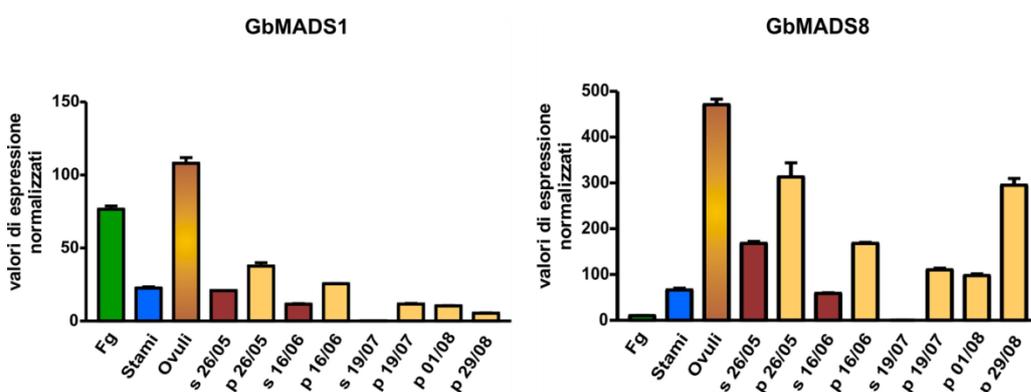


Figura 21: Profili di espressione ottenuti con esperimenti di Real time PCR. A destra l’analisi del trascritto *GbMADS1*. A sinistra analisi del trascritto *GbMADS8*. Legenda: fg: foglia; s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06.

Come si può vedere dalla figura 21 *GbMADS1* risulta essere molto espresso nella foglia, ma soprattutto nei giovani ovuli e poco negli stami. Inoltre, questo trascritto è espresso a livelli bassi anche nei campioni riguardanti la polpa, ma sembra essere soprattutto legato all’iniziale formazione di questa e non alla sua maturazione poiché cala progressivamente a livelli scarsamente rilevabili durante quest’ultima fase. I trascritti di *GbMADS8*, invece, sono scarsamente rilevabili nella foglia e bassa è la loro presenza negli stami. Sono espressi a livelli estremamente elevati nei giovani ovuli, mentre nello sviluppo della polpa si può

notare come l'espressione di questo gene abbia un picco nella fase iniziale della formazione del sarcotesta (p 26/05), per poi diminuire gradatamente nel corso dell'accrescimento tardivo e aumentare di nuovo in maniera consistente nella fase di maturazione vera e propria (p 29/08). Questo pattern di espressione, oltre ad indicare un coinvolgimento di *GbMADS8* nella formazione degli ovuli, suggerisce anche che esso possa avere un ruolo nella formazione e nella maturazione del "frutto" di *Ginkgo biloba*. Inoltre, siccome *GbMADS8* è in generale molto più espresso rispetto a *GbMADS1*, è plausibile ipotizzare che esso abbia un ruolo più marcato rispetto a quest'ultimo anche nella formazione iniziale del "frutto" (p 26/05) e nella sua maturazione (p29/08).

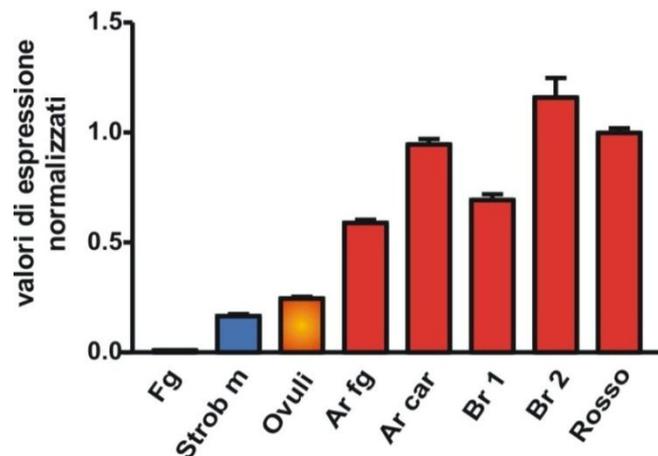


Figura 22: Profilo di espressione del trascritto di *AGL6* di tasso ottenuto con esperimenti di Real time PCR. Legenda: fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Per quanto riguarda la pianta di tasso, il trascritto di *AGL6* è poco espresso negli strobili maschili e negli ovuli mentre è per nulla espresso nella foglia (figura 22). Nel caso della polpa, è presente in tutti gli stadi di sviluppo e maturazione dell'arillo con un aumento dell'espressione nello stadio in cui l'arillo si sta trasformando in "frutto" diventando carnoso, ed un secondo aumento nello stadio breaker2 quando i processi di maturazione sono in pieno svolgimento. Questo

profilo indica un coinvolgimento del trascritto di *AGL6* nella formazione della polpa e anche nella fase di maturazione vera e propria.

Da questi risultati si può affermare che nello sviluppo sia nella polpa di ginkgo che nell'arillo di tasso intervenga almeno un gene di tipo MADS-box appartenente al gruppo degli *AGL6* e che questo possa avere un ruolo sia nell'iniziale formazione della carnosità del frutto che nella sua successiva maturazione.

4.1.2. ANALISI DEI GENI APPARTENENTI AL GRUPPO DEI *TM8*

Nel tentativo di isolare altri geni di tipo MADS-box coinvolti nella formazione dell'arillo di tasso, ho usato, tra l'altro, la tecnica descritta da Hileman et al. (2006). Questi autori sono stati in grado di isolare un gran quantitativo di geni MADS-box di pomodoro utilizzando particolari nucleotidi molto degenerati e condizioni di PCR poco stringenti. Ho scaricato dalla rete numerose sequenze di geni MADS-box di Gimnosperme e, dopo averle allineate, ho disegnato degli oligonucleotidi molto degenerati sulle regioni più conservate. L'idea è di riuscire a sfruttare il maggior grado di conservazione del dominio M per riuscire ad amplificare un gran numero di geni di tipo MADS-box, utilizzando la metodologia del 3' RACE. Tuttavia, questo metodo comporta una maggiore difficoltà nell'ottenere degli amplificati puliti e in quantità utili per il clonaggio. Inoltre, utilizzando un oligonucleotide molto degenerato accoppiato a un altro non sequenza-specifico come l'AUAP, (sezione Materiali e Metodi paragrafo 3.6) c'è la concreta possibilità di clonare altri frammenti di cDNA che non appartengono alla classe dei geni MADS-box. Nonostante tutto, sono riuscito ad isolare un frammento di cDNA di tasso comprendente una buona parte della regione codificante e l'intero 3'UTR di un fattore di trascrizione MADS-box che è risultato avere una similarità aminoacidica del 65% con una sequenza *TM8* di *Cryptomeria japonica* (numero di accesso AB359027) (allegato 6.2).

Nel caso di ginkgo nulla era noto riguardo alla presenza o meno di geni appartenenti al gruppo *TM8*. Da un'analisi bioinformatica delle sequenze geniche di MADS-box presenti in rete utilizzando il database Genebank è emersa la presenza di ben tre geni appartenenti al gruppo dei *TM8*: *GbMADS6* (numero di

accesso AB029468), *GbMADS7* (numero di accesso AB029469) e *GbMADS11* (numero di accesso AB029473). Per cercare di capire se effettivamente questi tre geni appartenessero al gruppo dei *TM8*, ho costruito un albero filogenetico con differenti geni di tipo MADS-box delle diverse famiglie in modo da capire a quale gruppo fossero vicini.

Come si può notare in figura 23 tutti i geni *TM8* da me utilizzati per formare l'albero filogenetico formano un unico clade. All'interno di questo si possono poi distinguere tre sottogruppi: uno contiene i geni *TM8* delle Angiosperme, il secondo contiene il gene *TM8* di tasso e i due *TM8* noti di *Cryptomeria japonica* (come era già successo nel caso degli *AGL6*), infine il terzo gruppo contiene i tre *TM8* di ginkgo.

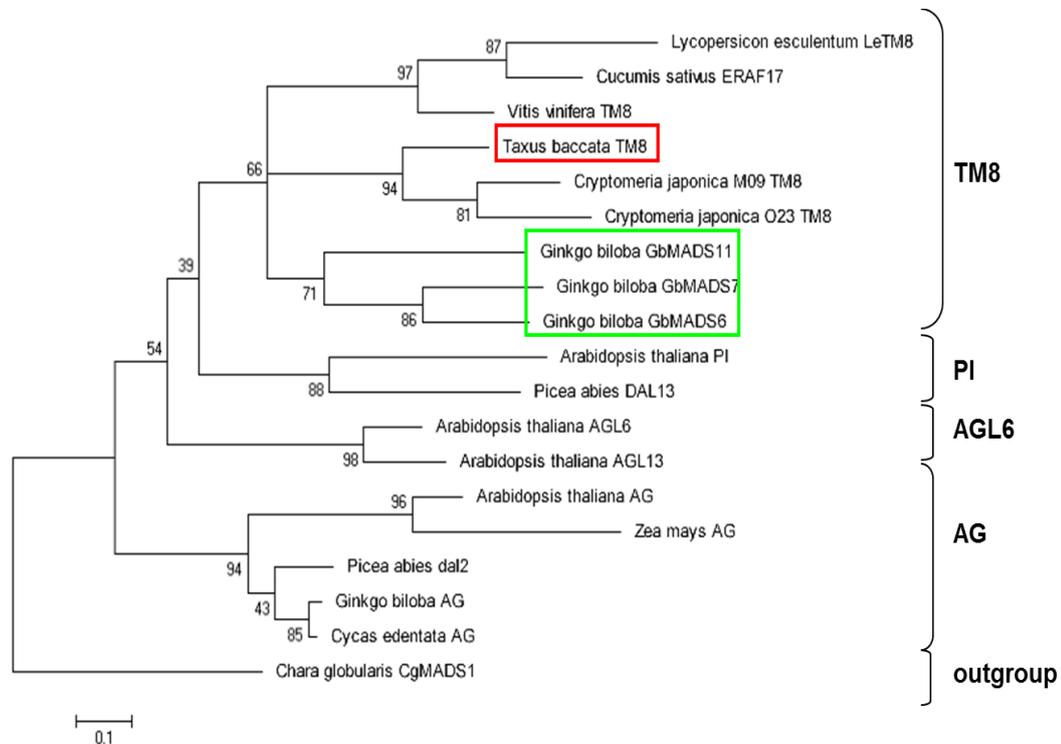


Figura 23: Albero filogenetico che evidenzia le relazioni dei geni MADS-box appartenenti al gruppo dei *TM8* finora conosciuti.

Il gene *TM8* (*Tomato MADS 8*) è stato isolato per la prima volta in pomodoro (Pnueli et al., 1991) ed è stato visto che in questa specie è espresso nei frutti fino a maturazione iniziata (Hileman et al., 2006). Per quanto riguarda le poche altre specie in cui è stato trovato, la situazione rimane poca chiara perché è stato finora poco studiato. Oltre ai due geni *TM8* in trovati in *Cryptomeria japonica*

(Futamura et al., 2008) ne è stato isolato uno in *Cucumis sativus* (Ando et al., 2001). In particolare nel cetriolo si è visto che questo fattore di trascrizione di tipo MADS è implicato nella formazione di fiori femminili (Ando et al., 2001). Nel caso della pianta modello *Arabidopsis thaliana* non sono stati trovati geni appartenenti a questa famiglia (Futamura et al., 2008).

Per cercare di capire se il *TM8* isolato in tasso fosse coinvolto nello sviluppo della polpa ho fatto degli esperimenti di espressione tramite Real time PCR.

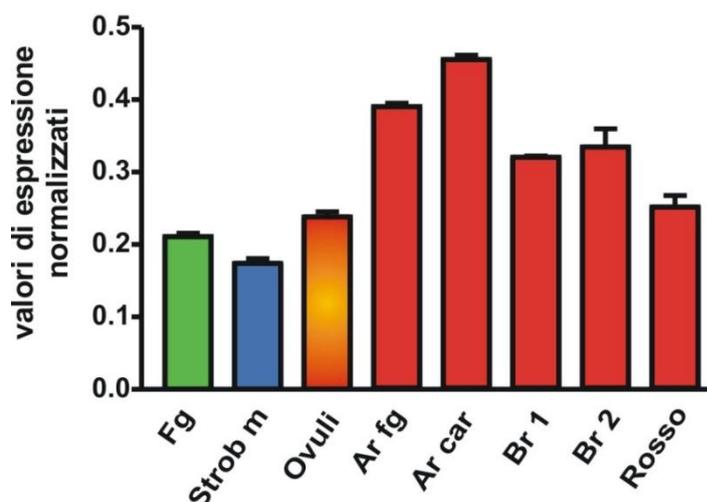


Figura 24: Profilo di espressione del trascritto *TM8* di tasso ottenuto con esperimenti di Real time PCR. Legenda: fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Dal profilo di espressione (figura 24) si può vedere come il *TM8* di tasso sia espresso sia nella foglia che nelle strutture riproduttive (strobili maschili e ovuli). Molto più interessante appare la situazione nell'arillo in quanto, oltre ad essere presente in quantità più elevata, il trascritto è presente in tutti gli stadi di sviluppo con un incremento significativo nel momento in cui l'arillo diventa carnoso (transizione arillo fogliaceo/arillo verde carnoso) per poi diminuire gradatamente negli stadi successivi (breaker1, breaker2 e arillo rosso).

Per cercare di capire se anche nel ginkgo i trascritti per *TM8* avessero un ruolo nello sviluppo della polpa, ho analizzato il profilo di espressione dei tre geni presi in considerazione. Per questo scopo ho progettato tre coppie di oligonucleotidi specifici in modo tale da non avere cross-ibridazione tra loro.

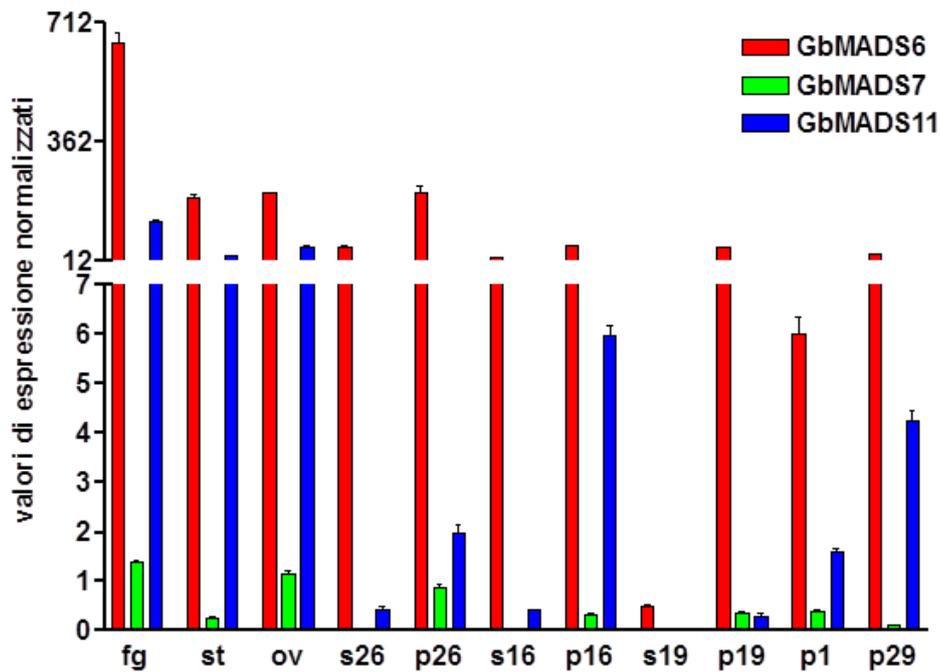


Figura 25: Profilo di espressione ottenuti con esperimenti di Real time PCR. In rosso *GbMADS6*; in verde *GbMADS7*; in blu *GbMADS11*. Legenda: s26: semi 26/05/06; p26: polpa 26/05/06; s16: semi 16/06/06; p16: polpa 16/06/06; s19: semi 19/07/06; p19: polpa 19/07/06; p1: polpa 1/8/06; p29: polpa 29/08/06.

Come si può vedere dalla figura 25 sia *GbMADS6* sia *GbMADS11* sono presenti in maniera rilevante in tutti i tessuti considerati e assumono un andamento interessante per quanto riguarda la polpa. In particolare *GbMADS6* è presente in maniera marcata nelle polpe campionate a primavera quando la struttura carnosa si sta formando (p26 e p16), per poi diminuire e aumentare nuovamente nei campioni che si riferiscono alle polpe che stanno maturando (p29). *GbMADS11* è meno espresso rispetto a *GbMADS6* e come si può notare dalla figura 25 ha un aumento di espressione nei campioni campionati in primavera (transizione tra p26 e p16) e un secondo incremento nel momento in cui avviene la maturazione vera e propria (p1 e p29). Il profilo di espressione di *GbMADS7* ricalca in parte quello di *GbMADS6* ma il livello di espressione è molto basso a indicare un probabile ruolo marginale di questo gene nella formazione e maturazione della polpa di ginkgo.

Questi dati mostrano chiaramente come vi sia un coinvolgimento dei geni *TM8* nello sviluppo della polpa di ginkgo (in particolare *GbMADS6*) e dell'arillo di tasso.

4.2 SINDROME DI MATURAZIONE

Del processo di maturazione dell'arillo di tasso e della polpa di ginkgo nulla era noto a livello molecolare. Allo scopo di studiare gli aspetti molecolari coinvolti nella maturazione di questi "frutti" e di confrontarli con i meccanismi che sono coinvolti nella maturazione dei frutti delle Angiosperme, ho deciso di dedicarmi in maniera più dettagliata ad alcuni aspetti della "sindrome di maturazione", cioè di quei cambiamenti che avvengono in un frutto quando matura. A tal proposito ho preso in considerazione diversi geni codificanti per enzimi che nei frutti delle Angiosperme sono coinvolti nel processo di rammollimento, nel cambiamento di colore e nella sintesi e percezione dell'etilene.

<u>Tasso</u>	<u>Ruolo dell'enzima</u>
β -galattosidasi	Rammollimento
Espansina	Rammollimento
Pectin-metilesterasi	Rammollimento
Pectato liasi	Rammollimento
Fitoene sintasi	Cambiamento di colore
Calcione sintasi	Cambiamento di colore
SAM sintetasi	Produzione di etilene
ACC ossidasi	Produzione di etilene
Recettori per l'etilene	Percezione dell'etilene

<u>Ginkgo</u>	<u>Ruolo dell'enzima</u>
Espansina	Rammollimento
Pectato liasi	Rammollimento
Fitoene sintasi	Cambiamento di colore
Calcione sintasi	Cambiamento di colore
SAM sintetasi	Produzione di etilene
ACC ossidasi	Produzione di etilene

Tabella 3: Quadro riassuntivo degli enzimi presi in considerazione per lo studio della sindrome di maturazione in tasso e ginkgo.

Le sequenze nucleotidiche di questi enzimi, ad eccezione della calcione sintasi di ginkgo (numero di accesso: AY496931), non erano note e quindi ho dovuto io stesso isolarle e caratterizzarle. Per ognuno ho scaricato dalla rete le sequenze geniche note sia di Gimnosperme sia di Angiosperme e dopo averle allineate, sulle regioni più conservate ho disegnato degli oligonucleotidi degenerati che mi permettessero di amplificare un frammento di cDNA. Nelle reazioni di amplificazione ho utilizzato del cDNA proveniente da tessuti in attiva maturazione. Dopo aver clonato e verificato tramite sequenza che effettivamente il segmento di cDNA fosse una parte della regione codificante l'enzima voluto ho disegnato degli oligonucleotidi specifici per esperimenti di Real time PCR.

4.2.1 RAMMOLLIMENTO

Al rammollimento partecipano diversi enzimi e per questo lavoro ne ho considerati alcuni che in letteratura sono noti per avere un ruolo durante la maturazione dei frutti di diverse Angiosperme. Sia in ginkgo che in tasso sono riuscito ad ottenere un frammento di cDNA codificante una pectato liasi (allegato 6.3, allegato 6.4) ed una espansina (allegato 6.5, allegato 6.6). In realtà, per quest'ultima ho ottenuto in tasso due sequenze diverse con un grado di omologia nucleotidica del 75%, da me chiamate EXP A ed EXP B. Solo per il tasso sono inoltre riuscito ad isolare anche un frammento di cDNA per una pectinmetilesterasi (PME) e uno per una β -galattosidasi (β -gal).

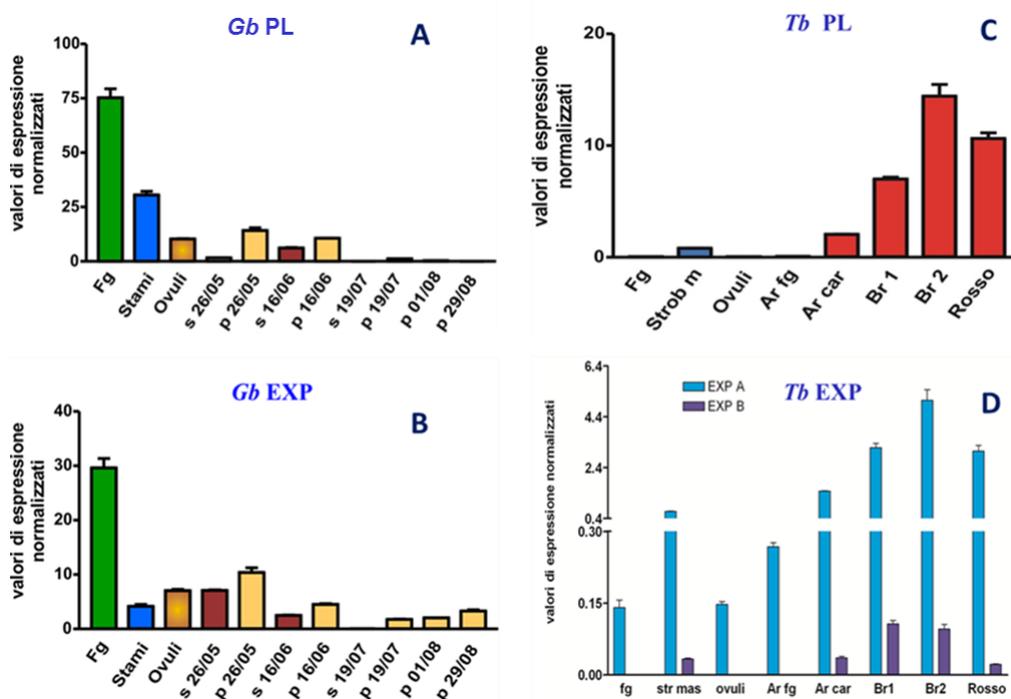


Figura 26: Profili di espressione ottenuti con esperimenti di Real time PCR. Espressione della pectato liasi rispettivamente in ginkgo (A) e in tasso (C). Espressione dell'espansina rispettivamente in ginkgo (B) e tasso (D). Legenda: *Gb*: *Ginkgo biloba*; *Tb*: *Taxus baccata*; PL: pectato liasi; EXP: espansina; s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06; fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Come si può vedere dal profilo di espressione, la pectato liasi di ginkgo (figura 26 A) è molto espressa nelle foglie giovani e, seppure in quantità meno rilevante, negli stami. Per quanto riguarda la polpa, il gene è espresso a livelli bassi nelle prime fasi della sua formazione (p26/5 e p16/6) e con andamento calante, mentre è in sostanza assente nelle fasi di maturazione. Sulla base di questo profilo di espressione è evidente come questo enzima sembri maggiormente coinvolto nei processi di distensione cellulare che accompagnano la crescita dei tessuti piuttosto che nel rammollimento associato alla maturazione. Allo stesso modo il profilo di espressione dell'espansina (figura 26 B) evidenzia livelli molto bassi, anche se con andamento crescente, nella polpa dei campioni tardivi (dal p19/7 al p29/8) quando dovrebbe esserci il rammollimento. Invece, si ha un'espressione più elevata nei campioni precoci di polpa (p26/5 e p16/6) quando le cellule si stanno distendendo, e ancor più elevata nelle giovani foglie che si stanno anch'esse distendendo. Quindi, anche nel caso dell'espansina il cDNA da me isolato sembra codificare più per un enzima coinvolto nei normali processi di distensione cellulare legati alla crescita piuttosto che per un enzima coinvolto nel rammollimento della polpa.

Invece, molto più interessante appare la situazione in tasso dove il profilo di espressione della pectato liasi (figura 26 C) mostra un andamento crescente con la maturazione, con un picco nel campione breaker2. Livelli più bassi si hanno negli strobili maschili mentre negli altri tessuti non si ritrova espressione per questo trascritto. Lo stesso vale anche per le due sequenze codificanti espansine. Entrambe hanno un profilo di espressione che aumenta con il procedere della maturazione con un picco nell'arillo breaker2. Livelli di espressione più bassi si ottengono invece negli strobili maschili mentre negli altri organi, in particolare le foglie, risulta essere praticamente nulla (figura 26 D). Da notare il fatto che, anche se hanno lo stesso profilo di espressione, EXP B probabilmente risulta avere un ruolo meno importante rispetto ad EXP A visto che i suoi trascritti sono in quantità molto più bassa.

Nel caso del tasso sono riuscito ad isolare le sequenze di cDNA per altri due enzimi che sono noti in letteratura per essere implicati nel processo di rammollimento associato alla maturazione dei frutti delle Angiosperme: β -galattosidasi (β -gal) (allegato 6.7) e pectinmetilesterasi (PME) (allegato 6.8).

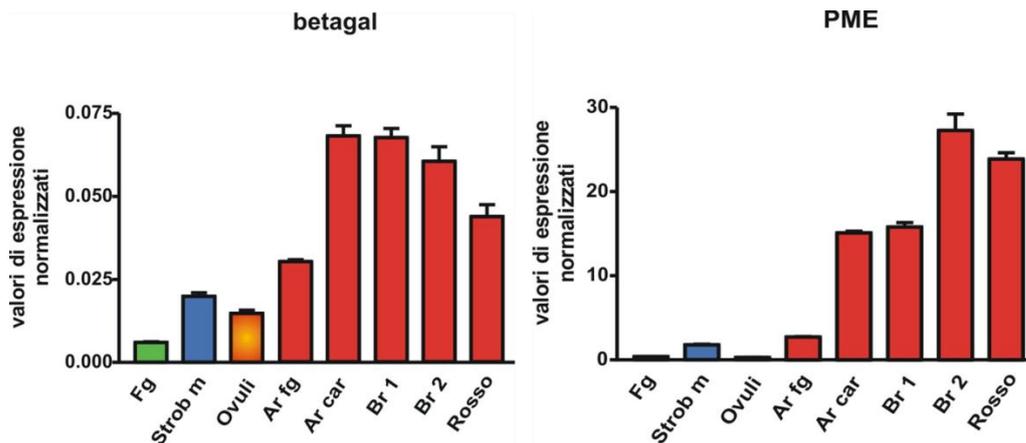


Figura 27: Profili di espressione ottenuti con esperimenti di Real time PCR. . Legenda: fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Il profilo di espressione di β -gal (figura 27) mostra come questo gene sia presente in tutti i campioni studiati. I livelli più alti si hanno nell'arillo verde carnoso, nel breaker1 e nel breaker2 mentre si abbassano leggermente nell'arillo rosso quando il rammollimento è completato. Questi dati indicano che il gene per la β -galattosidasi codifica per un enzima implicato nel rammollimento, e confermano il suo coinvolgimento precoce in questo processo, come dovrebbe essere per facilitare il successivo ingresso in parete di altri enzimi più tardivi (Brummell e Harpster, 2001). Invece il trascritto di PME (figura 27) è praticamente assente nelle foglie e negli ovuli e poco presente negli strobili maschili e nell'arillo fogliaceo. Alti livelli di espressione sono visibili solo negli arilli quando diventano carnosi e maturano, ed è interessante notare il repentino e marcato aumento nel passaggio arillo fogliaceo/arillo carnoso ossia nelle prime fasi della trasformazione dell'arillo in "frutto" carnoso.

Questi dati permettono di avanzare un paragone tra l'arillo di tasso e i frutti delle Angiosperme per quanto riguarda il rammollimento della polpa associato alla maturazione. Infatti, gli enzimi da me considerati mostrano un andamento di espressione crescente con il rammollimento dell'arillo e ricordano molto da vicino ciò che avviene nei frutti delle Angiosperme. Tuttavia, ciò non è altrettanto vero per la polpa di ginkgo poiché i due enzimi isolati sembrano essere coinvolti nei processi di distensione cellulare associati alla crescita, piuttosto che enzimi di rammollimento perché non sono presenti nelle polpe che stanno maturando.

4.2.2 CAMBIAMENTO DI COLORE

Il cambiamento di colore che avviene durante la maturazione dei frutti ha il compito di indicare che il frutto è maturo e di renderlo visibile agli animali che in questo modo lo distinguono dal fogliame verde della pianta. Come accennato in precedenza, nelle Angiosperme questo fenomeno può avvenire attraverso due vie: sintesi di carotenoidi oppure accumulo di antociani e/o flavonoidi. Per cercare di confrontare il fenomeno del cambiamento di colore nell'arillo di tasso e nella polpa di ginkgo con il processo che avviene nei frutti delle Angiosperme, ho isolato un frammento di cDNA per ciascuno dei due enzimi chiave nelle vie di sintesi di molecole colorate: la calcione sintasi (CHS) enzima coinvolto nella via di sintesi di antociani e flavonoidi (allegato 6.9) e la fitoene sintasi (PSY) enzima chiave per la sintesi dei carotenoidi (allegato 6.10 e 6.11).

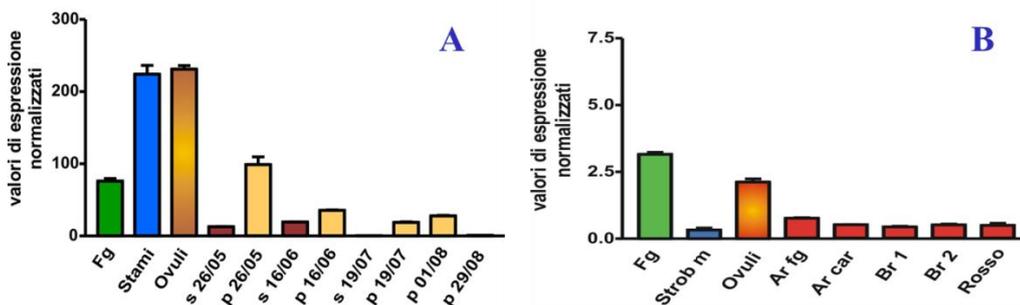


Figura 28: Profili di espressione di CHS ottenuti con esperimenti di Real time PCR. In (A) CHS di ginkgo. In (B) CHS di tasso. Legenda: s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06; fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Il profilo di espressione della calcione sintasi di ginkgo (figura 28 A) mostra due picchi molto elevati negli stami e negli ovuli. Il livello di trascritti nella foglia giovane è invece più basso mentre nella polpa si nota un'espressione più alta nel campionamento del 26/05/06 e un calo progressivo dell'espressione a mano a mano che la maturazione del sarcotesta avanza. Questi dati fanno pensare a un limitato coinvolgimento della calcione sintasi nella formazione del colore

giallognolo dei “frutti” di ginkgo. Il fatto che ci siano due picchi di espressione della CHS negli stami e negli ovuli potrebbe essere dovuto al ruolo protettivo dai raggi UV-B (280-320 nm) che i flavonoidi svolgono in queste strutture molto delicate che nelle Gimnosperme non sono protette da parti vegetative. Infatti, è noto che mutanti di *Arabidopsis thaliana* privi di attività calcione sintasica sono più sensibili alle radiazioni UV-B e crescono stentatamente in condizioni di crescita normali (Li et al.,1993). Il profilo di espressione della CHS (figura 28 B) di tasso mostra livelli di trascritto più accentuati nella foglia e negli ovuli mentre per quanto riguarda gli altri tessuti, compresi gli arilli ai diversi stadi di sviluppo, sembra essere appena rilevabile. Questi dati indicano come nella colorazione rossa dell’arillo maturo non ci sia coinvolgimento di pigmenti di natura fenolica come gli antociani.

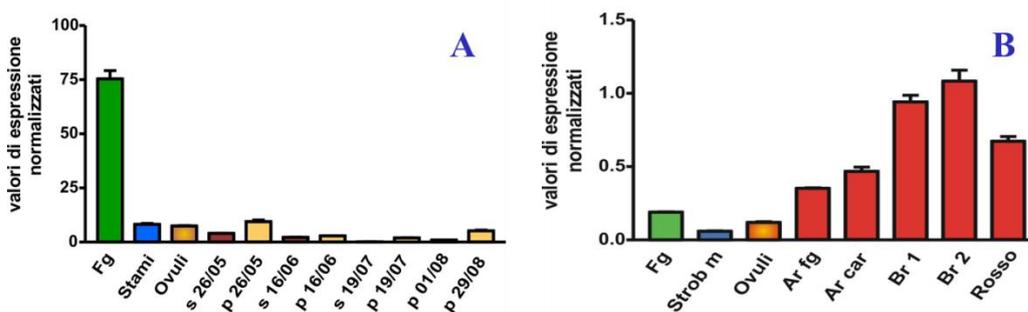


Figura 29: Profili di espressione di PSY ottenuti con esperimenti di Real time PCR. In (A) PSY di ginkgo. In (B) PSY di tasso. Legenda: s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06; fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnososo; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Il profilo di espressione della fitoene sintasi di ginkgo (figura 29 A) mostra livelli di trascritto apprezzabili solo nella foglia, ricca di cloroplasti e carotenoidi fotosintetici, mentre negli altri tessuti è in sostanza poco o per nulla rilevabile. Questo dimostra che nella colorazione della polpa di ginkgo non sia coinvolta sintesi *ex novo* di carotenoidi. Molto più interessante è la fitoene sintasi di tasso (figura 29 B), dove oltre alla presenza nella foglia, dovuta all’accumulo di carotenoidi fotosintetici, risulta essere particolarmente espressa nell’arillo. Il trascritto di PSY mostra livelli alti e crescenti di espressione nella polpa degli arilli

agli stadi breaker1 e breaker2, ossia quando ha inizio il cambiamento di colore da verde a rosso.

Nel caso della polpa di ginkgo il colore giallognolo assunto durante la maturazione potrebbe quindi essere semplicemente dovuto a carotenoidi fotosintetici già presenti e messi in evidenza in seguito alla degradazione delle clorofille, come succede in autunno con l'ingiallimento delle foglie o come avviene durante la maturazione del frutto di limone. In tasso invece i profili di espressione dimostrano come il colore rosso degli arilli possa essere dovuto all'accumulo di particolari carotenoidi come avviene, ad esempio, nei frutti di peperone, melone, pomodoro, ecc.

4.2.3 SINTESI E PERCEZIONE DI ETILENE

I frutti carnosi delle Angiosperme si dividono in climaterici e non climaterici in base al fatto che all'inizio della maturazione abbiano o no un picco di respirazione cellulare al quale è associato anche un picco di produzione di etilene. Per cercare di confrontare anche a questo livello i "frutti" di tasso e di ginkgo con i frutti delle Angiosperme, ho isolato e studiato l'espressione di due geni importanti nella sintesi di questo fitormone: la S-adenosil-L-metionina sintetasi (SAM sintetasi) (allegati 5.12 e 5.13) e l'1-amminociclopropan-1-carbossilico ossidasi (ACO) (allegati 5.14 e 5.15).

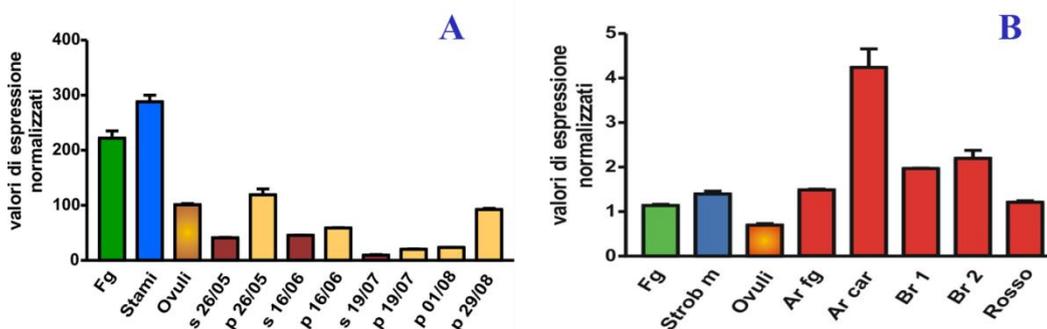
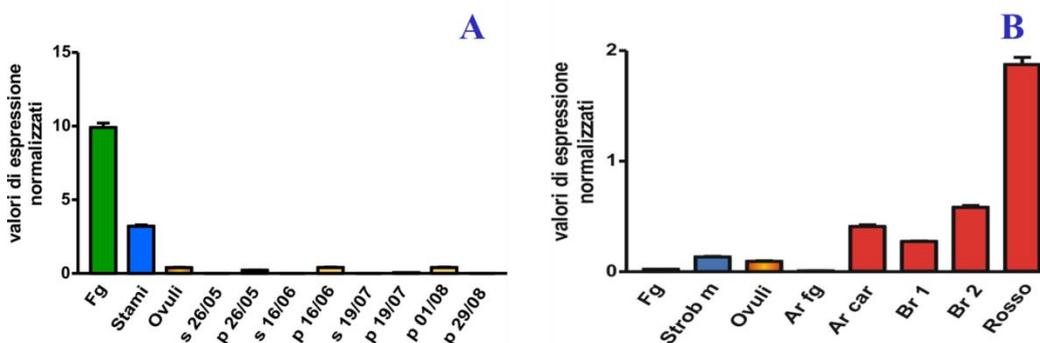


Figura 30: Profili di espressione della SAM sintetasi ottenuti con esperimenti di Real time PCR. In (A) SAM sintetasi di ginkgo. In (B) SAM sintetasi di tasso. Legenda: s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06; fg: foglia; strob m: strobili

Risultati e Discussione

maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

I dati ottenuti dalla Real time PCR mostrano che la maggior espressione della SAM sintetasi di ginkgo (figura 30 A) si ha nella foglia giovane e negli stami. Una discreta espressione è presente anche negli ovuli e nelle prime fasi di formazione della polpa (p26/5 e p16/6), mentre diminuisce progressivamente a mano a mano che ci si avvia alle fasi successive di maturazione per riprendere poi a salire nella polpa del campionamento più tardivo (p29/8) quando il “frutto” sta completando la maturazione. Questi dati suggeriscono che l'etilene potrebbe essere prodotto soprattutto nei tessuti giovani in crescita, cosa peraltro nota (Taiz e Zeiger, 2009), ma anche durante la maturazione. Nel caso del tasso (figura 30 B) si può vedere come il profilo di espressione ottenuto mostri la presenza della SAM sintetasi in tutti i tessuti. Tuttavia, livelli più alti sono presenti negli arilli che stanno diventando carnosi e poi maturano. Il fatto che ci sia la presenza di questo enzima nei diversi stadi di sviluppo e maturazione dell'arillo potrebbe suggerire che il composto SAM sia usato come precursore per la sintesi di etilene. In realtà, questo composto può anche essere usato come precursore delle poliammine e non solo per produrre etilene, quindi per meglio capire se effettivamente esso sia usato per produrre etilene oppure no, ho clonato e studiato, sia in ginkgo che in tasso, un cDNA codificante per l'enzima ACC ossidasi che catalizza l'ultima reazione e quindi il diretto responsabile della formazione di questo ormone vegetale.



Risultati e Discussione

Figura 31: Profili di espressione della ACC ossidasi ottenuti con esperimenti di Real time PCR. In (A) ACC ossidasi di ginkgo. In (B) ACC ossidasi di tasso. Legenda: s 26/05: semi 26/05/06; p 26/05: polpa 26/05/06; s 16/06: semi 16/06/06; p 16/06: polpa 16/06/06; s 19/07: semi 19/07/06; p 19/07: polpa 19/07/06; p 01/08: polpa 01/08/06; p 29/08: polpa 29/08/06; fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnososo; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

In ginkgo il trascritto di ACO (figura 31 A) ha evidenziato un'espressione quasi nulla in tutti i tessuti analizzati tranne la foglia giovane dove il livello è elevato, e gli stami con valori più bassi. Ciò indica chiaramente che viene prodotto etilene di crescita ma non di maturazione. Quindi è probabile che l'attività SAM sintetica osservata in precedenza serva nella polpa a produrre precursori per la sintesi di poliammine. Al contrario, in tasso (figura 31 B) i trascritti per ACO sono praticamente non rilevabili nelle foglie e negli arilli fogliacei, mentre iniziano a crescere quando gli arilli diventano carnososi per raggiungere poi un massimo negli arilli rossi maturi. È interessante notare come l'aumento di espressione nello stadio verde carnososo coincida con il massimo di espressione del gene per SAM sintetasi il cui prodotto, fornisce il substrato per la sintesi di etilene. Questi dati dimostrano che l'arillo di tasso durante la maturazione produce etilene. Il fatto che vi sia la produzione di questo fitormone mi ha spinto a cercare l'eventuale presenza di recettori per l'etilene (ETR) necessari per la percezione e successiva trasduzione del segnale (allegato 6.16).

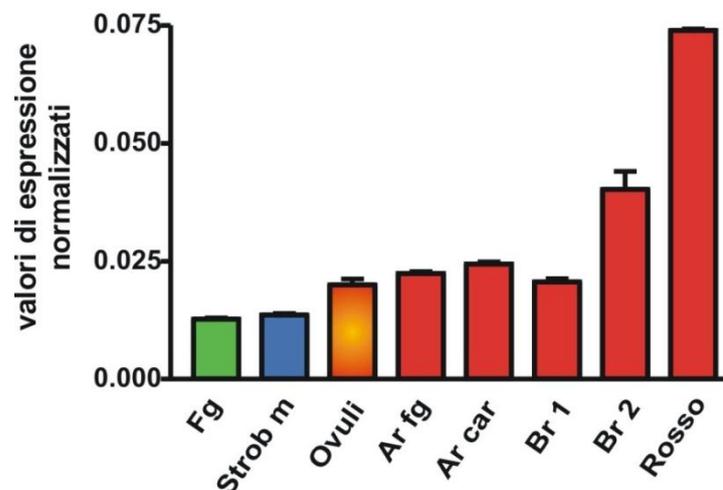


Figura 32: Profilo di espressione del recettore di etilene (ETR) di tasso ottenuto con esperimenti di Real time PCR. Legenda: fg: foglia; strob m: strobili maschili; Ar fg: arillo fogliaceo; Ar car: arillo carnoso; Br 1: arillo breaker1; Br 2: arillo breaker2; Rosso: arillo rosso.

Il profilo mostrato in figura 32 evidenzia come ci sia espressione del trascritto per l'ETR in tutti i tessuti. Questo risultato era atteso dato che tutte le cellule vegetali producono sempre livelli molto bassi di etilene. Più interessante appare l'aumento di espressione negli arilli allo stadio breaker2 e rosso, ossia in parallelo con l'osservato incremento di espressione di ACO e, quindi, di etilene. Visto l'andamento crescente dell'espressione di ACO e di ETR nell'arillo di tasso negli stadi in cui vi è la piena maturazione, è plausibile pensare che la produzione di etilene durante la maturazione di questa struttura carnosa possa in qualche modo essere paragonabile a ciò che accade nei frutti climaterici delle Angiosperme. Tipicamente, nei frutti climaterici l'etilene è prodotto con il sistema 2 che è caratterizzato dal fatto che l'ormone è in grado di stimolare la propria sintesi. In altre parole, trattamenti relativamente brevi con etilene esogeno sono in grado di indurre nei frutti climaterici la sintesi endogena di etilene che continua poi anche dopo la fine del trattamento. Per questo motivo ho compiuto un trattamento degli arilli con etilene e in seguito sono andato a guardare in che modo variava l'espressione genica di ACO. Ho deciso di utilizzare arilli allo stadio breaker2 poiché in questo stadio l'espressione di ACO è già iniziata, ma ancora lontana dai valori massimi che si osservano negli arilli rossi. I campioni da trattare sono stati divisi in tre lotti:

- A. punto 0 (campioni appena raccolti);
- B. 24 ore in aria;
- C. 12 ore in etilene più 12 ore in aria;
- D. 48 ore in aria;
- E. 24 ore in etilene più 24 ore in aria

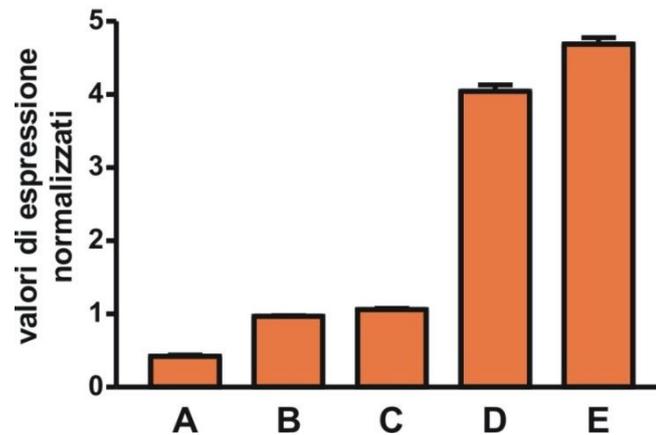


Figura 33 : Profilo di espressione del gene per ACO in arilli di tasso campionati al punto zero (A), dopo un trattamento di 24 ore con aria (B), dopo trattamento di 12 ore con etilene e 12 ore con aria (C), dopo un trattamento di 48 ore con aria (D) e dopo un trattamento di 24 ore con etilene e 24 ore di aria (E).

Il profilo ottenuto mostra che l'espressione di ACO è in sostanza la stessa nei due trattamenti (figura 33) e quindi l'etilene esogeno non è stato in grado di stimolare la sintesi endogena di ormone.

Dai dati ottenuti con questi esperimenti, si può concludere che i "frutti" di ginkgo e di tasso hanno un comportamento diverso per quanto concerne la produzione di etilene. Infatti, la produzione di quest'ormone durante la maturazione avviene solo negli arilli di tasso e non nella polpa di ginkgo. Tuttavia, l'arillo di tasso, anche se produce etilene durante la maturazione, non può essere paragonato ai frutti climaterici delle Angiosperme perché la sua sintesi non sembra avvenire in maniera autocatalitica.

5. CONCLUSIONI

La comparsa del frutto ha dato un contributo fondamentale al successo evolutivo delle Angiosperme poiché favorisce la dispersione dei semi in esso contenuti permettendo in questo modo la colonizzazione di nuovi ambienti. In particolare, le piante che producono frutti carnosì si avvalgono dell'aiuto di animali frugivori che, cibandosi dei frutti e muovendosi liberamente nell'ambiente, riescono a disperdere i semi anche molto lontano dalla pianta che li ha generati. Tuttavia, i semi non sono esclusivi delle Angiosperme ma sono prodotti da tutte le Spermatofite e, quindi, anche dalle Gimnosperme, piante che non sono in grado di produrre dei veri frutti non essendo provviste di fiori e quindi di ovari. Molte di esse però presentano attorno ai semi delle strutture carnose che possono essere mangiate dagli animali favorendo in questo modo la dispersione dei semi e comportandosi, almeno da un punto di vista funzionale, come dei frutti veri e propri. I risultati ottenuti con questo lavoro dimostrano come le strutture carnose delle due Gimnosperme da me studiate abbiano molte somiglianze con i veri frutti delle Angiosperme sia per quanto riguarda il loro sviluppo che per quanto riguarda la loro maturazione.

Per lo sviluppo, in particolare, si è visto che due differenti geni MADS-box, *AGL6* e *TM8*, sono espressi durante la formazione e la maturazione sia dell'arillo di tasso che della polpa di ginkgo. Considerando il fatto già noto, che anche il gene *AGAMOUS* partecipa allo sviluppo e alla maturazione dell'arillo di tasso e del "frutto" di ginkgo (Lovisetto, 2007) si può concludere che nello sviluppo delle strutture carnose che circondano i semi di tasso e di ginkgo sono implicati geni regolativi simili a quelli espressi nei frutti veri. Da questo punto di vista, quindi, le due Gimnosperme prese in esame producono dei frutti confrontabili con quelli delle Angiosperme.

Per quanto riguarda la maturazione, ho clonato e studiato alcuni frammenti di sequenze geniche coinvolte nel processo di rammollimento della polpa, nel cambiamento del colore e nella sintesi e trasduzione di etilene, un ormone che gioca un ruolo chiave nella maturazione dei frutti climaterici (banana, mela, pomodoro, ecc.). I risultati di questo studio hanno mostrato che nella maturazione dell'arillo di tasso è coinvolto lo stesso tipo di geni che operano nella maturazione

Conclusioni

dei veri frutti delle Angiosperme. Se si considera che anche fra le Angiosperme ci sono esempi in cui le strutture carnose che accompagnano i semi non derivano dall'ovario, come ad esempio la polpa delle fragole e la polpa di mele e pere, si capisce come la situazione primitiva presente nelle Gimnosperme possa essere rimasta attiva anche in piante più evolute. Tuttavia, per quanto riguarda il coinvolgimento dell'etilene, sembra che esso abbia un ruolo durante la maturazione dell'arillo ma differisca da quanto si osserva nei frutti climaterici delle Angiosperme. Invece, nel caso del ginkgo visivamente sembra che la polpa vada incontro a un processo di senescenza in generale più che di maturazione. Infatti, i profili di espressione dei geni da me considerati non concordano con ciò che avviene nei frutti delle Angiosperme e danno piuttosto l'idea di avere un ruolo molto marginale nella maturazione. Questo processo di maturazione più rudimentale potrebbe quindi essere messo in relazione con la maggiore antichità del gruppo tassonomico delle *Ginkgoales* comparso circa 100 milioni di anni prima rispetto al gruppo delle *Taxaceae*.

Nome informale	Gruppo tassonomico	Prima discutibile attribuzione	Origine - estinzione	mya
Cycadofite	Cycadales	Carbonifero	Permiano	299-251 - oggi
“	Bennettitales †		Triassico - Cretaceo	251-65,5
Ginkgofite	Ginkgoales	Carbonifero sup.	Permiano inf.	299-271-oggi
Conifere	Voltziales †		Carbonifero sup. - Permiano sup.	318-251
“	Coniferales		Trias	251-200-oggi
	Pinaceae		Trias	251-200-oggi
	Cephalotaxaceae		Giurassico	200-145-oggi
	Taxaceae		Giurassico medio	176-161-oggi
	Gnetales	Permiano sup.	Cretaceo inf.	145-100-oggi

Figura 34: Tabella che riporta le date presunte di comparsa dei principali gruppi di Gimnosperme. Dati presi da Taylor et al., 2009 e da Zhou (2009).

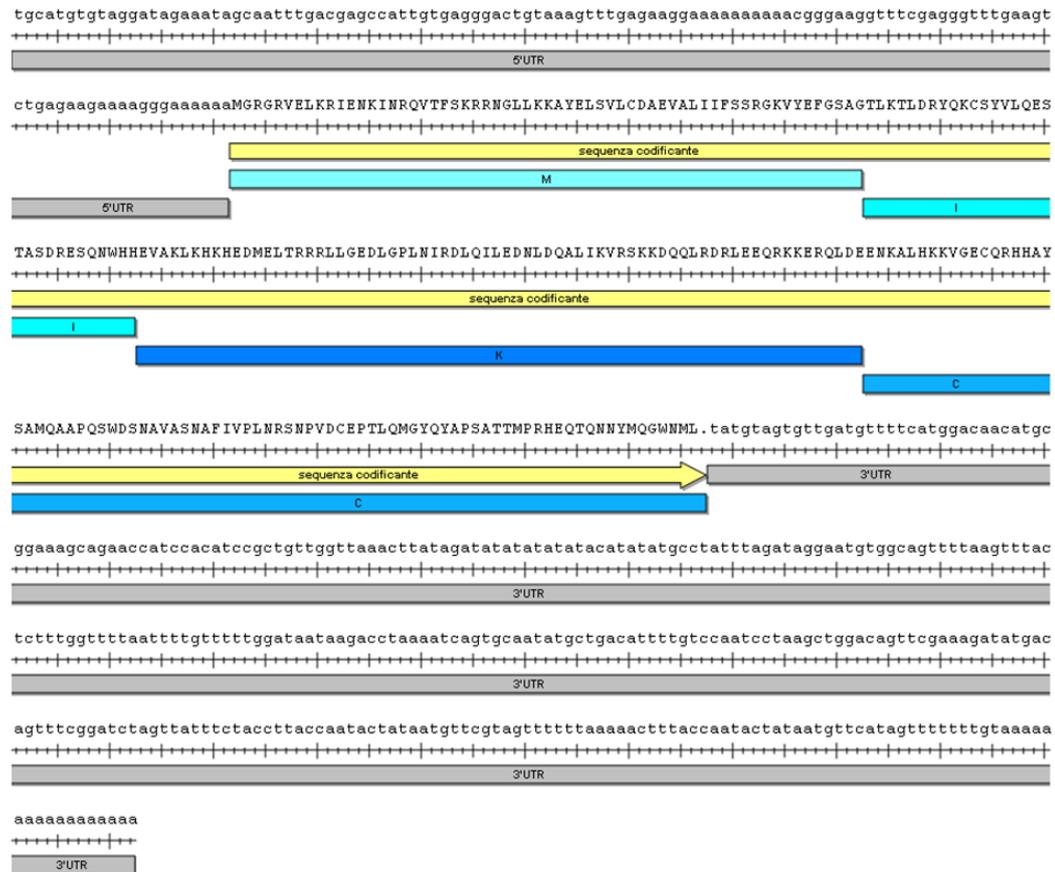
In conclusione, quindi, con questo lavoro si può affermare che le strutture carnose di queste Gimnosperme possono essere considerate dei frutti a tutti gli effetti per quanto riguarda la loro funzione, sviluppo e modalità di maturazione

Conclusioni

(quest'ultima per il solo tasso). Per questo motivo si può azzardare l'ipotesi che i meccanismi molecolari di base coinvolti nella formazione dei frutti carnosì siano in realtà comparsi già con l'avvento delle Gimnosperme e quindi è plausibile ipotizzare che il frutto si sia evoluto in parallelo con l'avvento del seme, precedendo così la comparsa del fiore.

6. ALLEGATI

6.1 SEQUENZA AGL6 DI *Taxus baccata*



Allegato 6.1: Sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta di *AGL6* di tasso. In grigio 5' UTR e 3' UTR. In giallo la sequenza aminoacidica dedotta. Abbreviazioni: M, I, K, C corrispondono ai domini dei geni MADS-box di tipo MIKC.

Strategia di clonaggio

Per clonare *AGL6* di tasso sono state allestite delle PCR a gradiente su cDNA di ovuli e gli oligonucleotidi che hanno permesso di ottenere risultati soddisfacenti sono *AGL6_deg_for4* e *AGL6_deg_rev3*. Con questa coppia si è allestita una

Allegati

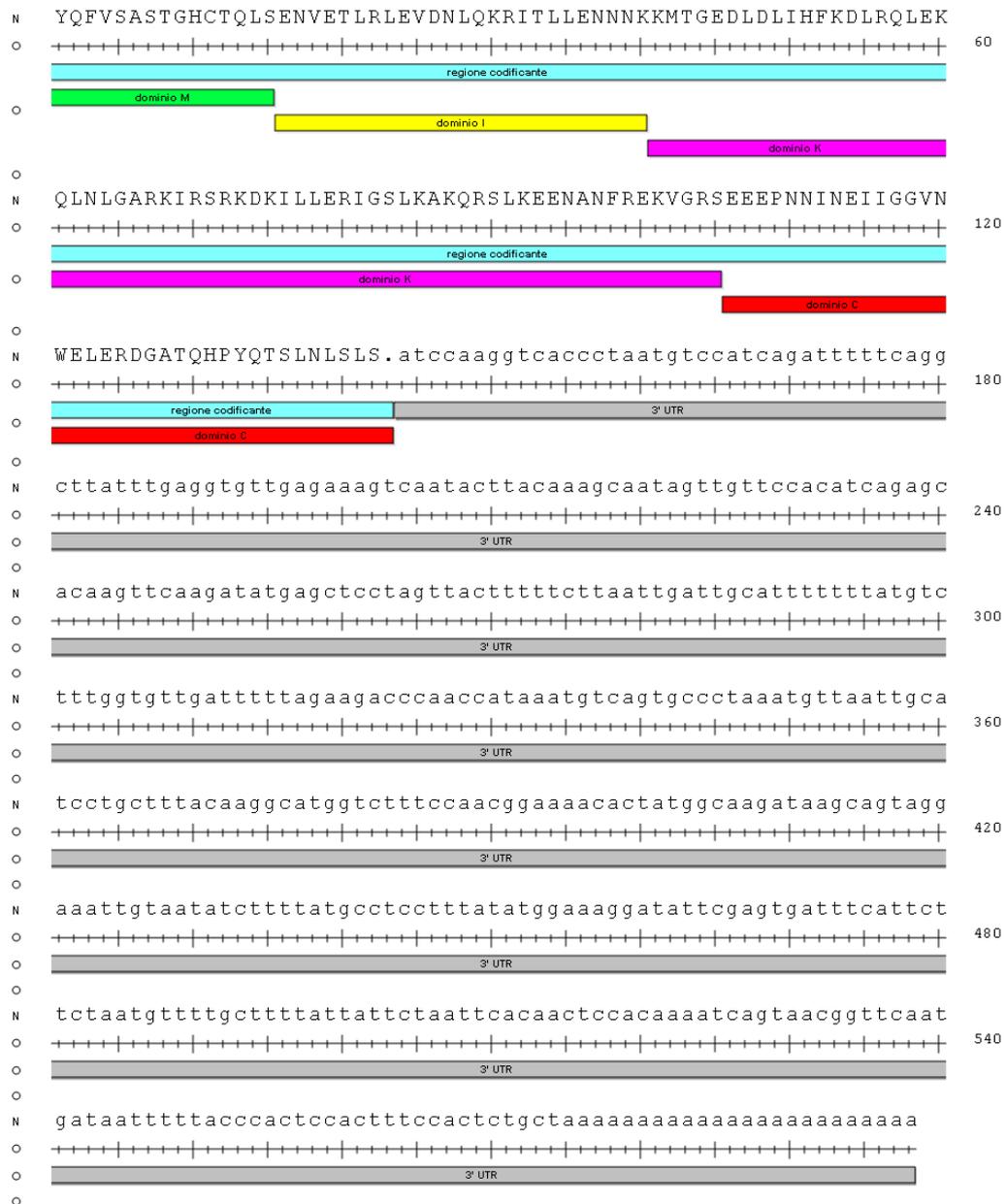
PCR a gradiente alle temperature di annealing di 46, 48, 50, 52°C. Il prodotto di PCR a 46°C è stato successivamente riamplicato con un'altra PCR a gradiente alle temperature di annealing di 46, 48, 50, 54°C. In questa seconda PCR è stato usato lo stesso oligonucleotide di ritorno mentre come oligonucleotide forward si è usato AGL6_deg_for2 il quale, agendo più a valle del precedente, ha permesso di ottenere un amplificato più pulito e delle dimensioni attese (circa 300 bp). Il prodotto di PCR a 54°C è stato purificato (paragrafo 3.9), clonato (paragrafi 3.11 e 3.12) e sequenziato. Per cercare di completare la sequenza è stato disegnato un oligonucleotide forward specifico (Tb_AGL6_GSP3_for) che è stato accoppiato poi all'oligonucleotide AUAP (sezione Materiali e Metodi paragrafo 3.6).

AGL6_deg_for4	5' ATGGGRCGWGGNMGVGTVSAG 3'
AGL6_deg_for2	5' GAGAAYAARATHAAYCGNCAGG 3'
AGL6_deg_rev3	5' TCTTCHCCYADNARRYKCCTTTG 3'
Tb_AGL6_GSP3_for	5' GGATCAACAATTGAGAGACAGGCT 3'

Per completare la sequenza al 5' è stato sintetizzato il cDNA a partire da RNA di arillo breaker2 (paragrafo 3.7). Si è utilizzato per la sintesi l'oligonucleotide Tb_AGL6_int_REV. Il cDNA ottenuto è stato usato per un'amplificazione usando l'oligonucleotide Tb_AGL6_real_REV e l'oligonucleotide Abridge Anchor Primer (paragrafo 3.7). La reazione di amplificazione è stata effettuata alle temperature di 58°C e 60°C. Il prodotto di PCR a 58°C è stato purificato (paragrafo 3.9) e clonato (paragrafi 3.11 e 3.12).

Tb_AGL6_int_REV	5' CTTTCGAACTGTCCAGCTTAGGAT 3'
Tb_AGL6_real_REV	5' GTCCAAGATCTTCCCCTAATAAACG 3'

6.2 SEQUENZA *TM8* DI *Taxus baccata*



Allegato 6.2: Sequenza nucleotidica e aminoacidica dedotta di *TM8* di tasso. In grigio 3' UTR. In celeste la sequenza aminoacidica dedotta. Abbreviazioni: M, I, K, C corrispondono ai domini dei geni MADS-box di tipo MIKC.

Strategia di clonaggio

È stata fatta inizialmente una TD-PCR (paragrafo 3.8), dove nei primi 20 cicli la temperatura di annealing scendeva da 60°C a 58°C mentre negli ultimi 20 cicli l'annealing è stato effettuato mediante un gradiente a quattro temperature diverse (54, 56, 58 e 60°C). Gli oligonucleotidi degenerati utilizzati in questa prima amplificazione sono stati QVT1_primer e AUAP (paragrafo 3.6). Il prodotto di PCR a 60°C è stato poi riamplicato con un'altra TD-PCR eseguita nelle stesse condizioni della precedente ma con un oligonucleotide forward diverso: RQV_MADS_FOR. Il prodotto di PCR ottenuto a 60°C è stato infine riamplicato con una PCR a gradiente (annealing a 60, 61, 62 e 63°C) usando come oligonucleotidi GLL_MADS_FOR e AUAP. Il prodotto di PCR a 61°C ottenuto da quest'ultima PCR presentava delle bande delle dimensioni attese (circa 900-1000 bp). Queste bande sono state excise da gel (paragrafo 3.10) e clonate (paragrafi 3.11 e 3.12) come suggerito dal lavoro di Hileman et al. (2006).

QVT1_primer	5'CARGTNACNTTYNSNAARMGNNMGNNNNGGNYTNYT NAA 3'
RQV_MADS_FOR	5' GRCARRTNACNTTYKSNAARMG 3'
GLL_MADS_FOR	5' GGNYTNHTNAARAARGCNNRNGA 3'

6.3 PECTATO LIASI DI *Ginkgo biloba*

a. Sequenza nucleotidica

ATTGATGGAAGAGGTGCCAATGTTACATTGCAAACGGCCCCTGCAT
CACAGTACAGTATGTTACCAACATTATCATTTCATGGCATCCATATCCA
TGA CTGTAAGCCTGGAGGAAATGCCATGGTGAGGGACTCTCCTGGT
CACTATGGCTGGAGAACAATAAGTGATGGAGATGGCGTTTCTATCTT
TGGAGGAAGTCATATATGGGTAGACCATTGCTCTCTGTCCA **GCTGTG**
CTGATGGCCTGATTGATGCCATCAGAGGCTCTACTGCTATTACTATC
TCAAACAACCTTCATGACACACCATGATAAGGTTATGCTCCTGGGTCA
CAGTGATGAATATACACCAGATACTAATATGCAAGTAACTATTGCATT
CAAC **CACTTTGGGGAGGGCTTGGT**GCAGCGCATGCCTAGATGCCGA
CATGGATACTTCCATGTT

b. Sequenza aminoacidica dedotta

IDGRGANVHIANGPCITVQYVTNIIHGIHIHDCKPGGNAMVRDSPGHYG
WRTISDGDGVSIFGGSHIWVDHCSLSSCADGLIDAIRGSTAITISNNFMT
HHDKVMLLGHSDYTPDTNMQVTIAFNHFGGLVQRMPRCRHHGYFHV

Allegato 6.3: Pectato liasi di *Ginkgo biloba*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

E' stata allestita una PCR a gradiente (temperature di annealing di 48, 50, 52 e 54°C) utilizzando gli oligonucleotidi PL for1 e PL rev1 e usando come templatò il cDNA relativo alla polpa del 26/5/06 e del 16/6/06, campionamenti in cui si nota un rammollimento della polpa. Poiché il campione corrispondente alla polpa del 16/6/06 a 50°C ha dato una banda delle dimensioni attese (circa 500 bp), è stato purificato (paragrafo 3.9) e in seguito clonato (paragrafi 3.11 e 3.12).

PL for1	5' CTBMTCATGAAYWSYTWCAAGAC 3'
PL rev1	5' CAGTGVRYRTAVTCRTTGTTTAC 3'

6.4 PECTATO LIASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

ATTGATGGCCGTGGCGTCAATGTCCACATCGCCAATGGGCCGTGTC
 TAACCATACAATATGTGACCAATATCATCATTACGGAATTCACATTC
 ACGACTGTAAGCCCGCGGGTAACGCGATGGTGAGAAGCTCGCCCAC
 GCACTACGGGTGGAGAACAATCAGCGACGGCGATGGCGTGTCCATC
 TTCGGAGGGAGTCACGTTTGGGTGGACCATTGCTCACTGTGAGAT
 GCGCCGACGGCCTGATCGACGCCATCATGGGATCCACTGCCATTAC
 CATTCCAA TAACCATTTYGCTCATCACAACGAGGTGATGCTGTTGG
 GCCACAGCGACAGCTACACGCCGGACACAATTATGCAGGTGACCAT
 TGCATTCAACCATTTTGGCGCAGGTCTTGTGCAACGAATGCCAAGGT
 GCAGGCACGGCTACTTTCATGTG

b. Sequenza aminoacidica dedotta

IDGRGVNVHIANGPCLTIQYVTNIIHGIHHDCKPAGNAMVRSSPTHYGW
 RTISDGDGVSIFGGSHVWVDHCSLSRCADGLIDAIMGSTAITISNNHFAH
 HNEVMLLGHSYSYTPDTIMQVTIAFNHFGAGLVQRMPRCRHHGYFHV

Allegato 6.4: Pectato liasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Per clonare la pectato liasi di tasso è stata allestita una PCR a gradiente in cui sono stati impiegati gli stessi oligonucleotidi degenerati utilizzati per identificare la PL di ginkgo (allegato 6.3). L'analisi è stata eseguita sul breaker 1 e sul breaker 2. La reazione è stata condotta utilizzando quattro temperature di annealing diverse: 48, 50, 52 e 54°C. Visto che il campione breaker2 a 50°C mostrava una banda delle dimensioni attese (circa 500 bp) è stato purificato (paragrafo 3.9) e clonato (paragrafi 3.11 e 3.12).

6.5 ESPANSINA DI *Ginkgo biloba*

a. Sequenza nucleotidica

```
TTCAACAATGGGCTTAGCTGCGGAGCCTGCTACGAAATGAAATGCAA  
TGACGACCCRCAATGGTGCTTGCCTGGTACAGTGGTCGTCACCGCT  
ACCAATTCTGCCCACCAAACAATGCTCTTCCAACGATAATGGCGG  
ATGGTGCAACCCCTCTGCAGCACTTYGACATGGCCGAGCCTGCT  
TATCAGCAGATTGCCAAGTACAGGAGTGGCATTGTCCCYATCGTCTT  
CAGAAGGGTGCCATGCC TGAAGAAGGGAGGAATCCGGTTTAGCATA  
AACGGCCATTCATACTTCAA
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
FNNGLSGACYEMKCNDDPQWCLPGTVVVTATNFCPPNNALPNDNGG  
WCNPPLQHFDMAEPAYQQIAKYRSGIVPIVFRVPCPKKGGIRFSINGH  
SYF
```

Allegato 6.5: Espansina di *Ginkgo biloba*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con la coppia di oligonucleotidi riportata in seguito è stata eseguita una PCR a gradiente alle temperature di annealing di 46, 48, 50 e 52°C. E' stato utilizzato come materiale di partenza del cDNA di ginkgo proveniente dalla polpa dell'1/8/06, tessuto che mostrava un iniziale rammollimento. Tutti i campioni hanno dato la banda di dimensioni attese (circa 330 bp) e quindi è stato purificato (paragrafo 3.9) e clonato (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 52°C.

Exp_deg_for2	5' AGYACHGCBCTNTTCAACA 3'
Exp_deg_rev2	5' GTDAYNAGNACNARRTTGAAGTA 3'

6.6 ESPANSINA DI *Taxus baccata*

In tasso sono stati isolati due frammenti successivamente denominati EXP_A e EXP_B

a. Sequenza nucleotidica EXP_A

GTTGAAGTATGAGTGACCATTAATGGTGAATCGGATTCCTCCCCTTC
TGTGGGGGCACTCTTTGGTACATAACAGGGACAATGCCCGCCCTGT
ACTTTGCAATGTTGAAAACAGGTTCCGACAGATCAAAGTGCTCTAA
TGGAGGATTGCACCACCCCCTGCGTTGTTGGGAAGTGC GTTGT
GGTGGGCAGAAATTAGTGGCAGTGACCACGATTGTATTGGGAAGGC
ACCACTGTGGATCGTCATTGCACTTAATTGCATAGCATGATCCGCAG
CTCAGTCCATTGTTGAACAG

b. Sequenza aminoacidica dedotta EXP_A

LFNNGLSGSCYAIKCNDDPQWCLPNTIVVTATNFCPPNNALPNNAGG
WCNPPLEHFDLSEPVFEHIAKYRAGIVPVMYQRVPCHRRGGIRFTINGH
SYFN

Allegati

c. Sequenza nucleotidica EXP_B

AATTCGCCCTTGTGACCAGGACAAGATTGAAGTAGGAATGCCCATTA
ATGGTGAATCGAACTCCTCCCTTCCGCAGGCAGGGCACCCCTCCTGA
ACAGAATTGGGACTATTCCGCTTCTGTACTTGGCAATCTGCTCGTAG
GCAGGCTCAGCCATGTCTAAGTGCTGTAGAGGAGG**GTTGCACCATC**
CTCCGTTGTCGTTGGGCAGGGCATTGTTTGGCGGGCAGAAGTTGGT
GGCGGTAACAGTCACAGTCCCCGGCAGACACCATTGAGGGTCGTCCG
TTGCACT**TCATTTCATAACAGGCTCCGCAGG**TGAGGCCATTGTTGAA
TAGCGCAGTACTAAGGGC

d. Sequenza aminoacidica dedotta EXP_B

ALSTALFNNGLTGACYEMKCNDDPQWCLPGTVTVTATNFCPPNNALP
NDNGGWCNPPLQHLDMAEPAYEQIAKYRSGIVPILFRRVPCLRKGGVR
FTINGHSYFNLVLVTRAN

Allegato 6.6: Espansina di *Taxus baccata*. In (a) e (c) la sequenze nucleotidiche rispettivamente di EXP_A e EXP_B. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) e (d) le sequenze aminoacidiche dedotte rispettivamente di EXP_A ed EXP_B.

Strategia di clonaggio

E' stata usata la stessa coppia di oligonucleotidi degenerati utilizzata per clonare l'espansina di ginkgo (allegato 6.5). È stata allestita una PCR a gradiente su cDNA breaker 2, condotta alle temperature di annealing di 46, 48, 50 e 52°C. Tutti i campioni mostravano una banda delle dimensioni attese (circa 330 bp) e quindi si è deciso di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 52°C.

6.7 β -GALATTOSIDASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

TGGGTTCAATCAACTGGCAACGTACTTGTACTGTTYGAAGAAGTGGG
AGGAGATCCTACTCAAATCTCATTGACTCGGACAGTAAAACTTT
ATGTTACATGTATCA **GAGACACATCTTGCACCCGTGGAT** TTATGGC
AGTTAAATACAAAGAGTGAATCAAAAGGGACCAAACCAAAGCCAGAA
CTTCAGTTACATTGTCCAT **CATCTGGGCAAGTCATCTCATCCA** TMAA
GTTTGCAAGCTTCGGAAGGGCGAATT

b. Sequenza aminoacidica dedotta

WVQSTGNVLFEEVGGDPTQISFMTRTVKTLCSHVSETHLAPVDLWQ
LNTKSESKGTKPKPELQLHCPSSGQVISSIKFASFGRAN

Allegato 6.7: β -galattosidasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con gli oligonucleotidi riportati in seguito, è stata allestita una PCR a gradiente alle temperature di annealing di 46, 48, 50 e 52°C. Si è deciso di cercare il gene nel cDNA di tasso nello stadio breaker 2, momento in cui l'arillo è in piena fase di rammollimento. Tutti i campioni hanno mostrato una banda delle dimensioni attese (circa 300 bp), quindi si è scelto di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 52°C.

β GAL_deg_for2	5' TAYCATGTHCCWMGDYCNCTGGG 3'
β GAL_deg_rev2	5' CCRAARCTTGCAAACCTTDAT 3'

6.8 PECTINMETILESTERASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

```
TTCGTCTTCGGAAACGCTGCGGTTGTTTTGCAGAACAGCAATTTGTA  
CGCCCGTAAACCCTTAGAAAACCAGAAGATAATGTACACCGCTCAGG  
GCAGGCAGGACCCCAATCAGAACACCGGCATCTCCATTCAAACCTG  
CAGGGTGACCGCAGACTCGGACCTCGCTGCCGTGAAGAGTTCGTTT  
AAGGTTTATCTGGGCAGGCCGTGA
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
FVFGNAAVVLQNSNLYARKPLENQKIMYTAQGRQDPNQNTGISIQNCRV  
TADSDLAAVKSSFVYLGRPW
```

Allegato 6.8: Pectinmetilesterasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con gli oligonucleotidi riportati in seguito è stata allestita una PCR a gradiente usando come template il cDNA derivante dall'RNA di arillo breaker 2 utilizzando quattro temperature di annealing diverse: 46, 48, 50 e 52°C. Tutte le reazioni hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (circa 250 bp) e quindi è stato purificato (paragrafo 3.9) e clonato (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 48°C, in quanto era quello che presentava una maggiore quantità di amplificato.

PME_deg_for	5' GGNACHRTNGABTTCRTCTTYGG 3'
PME_deg_rev	5' GTNCKNGARTAYTBYYTCCA 3'

6.9 CALCONE SINTASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

```
GAGTGGGGTCAGCCCAAGTCGAAGATCACACACCTCCTCTTCTGCA
CCACCAGCGGCGTSGACATGCCC GGCGCAGACTACCAACTCACTAA
ATTACTGGGACTCCGCCCTTCCGTGAAGAGAGTGATGATGTATCAAC
AGGGCTGCTTCGCGGGCGGCACAGTTCTCCGCGTCGCCAAAGACCT
CGCA GAGAACAACCGCGGAGCCAGAGT CCTGGTCGTCTGCAGCGA
GATCACCGCCGTCACCTTCCGCGGCCCTCCGACACCCACCTCGAC
AGTCTCGTCGGCCAAGCHCTTTTCGG
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
EWGQPKSKITHLLFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRVMMYQQG
CFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSL VGQ
ALF
```

Allegato 6.9: Calcione sintasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con gli oligonucleotidi riportati in seguito è stata allestita una PCR a gradiente usando come template il cDNA derivante dall'RNA di arillo breaker 2 utilizzando quattro temperature di annealing diverse: 46, 48, 50 e 52°C. La reazione che ha dato i risultati migliori è stata quella a 52°C (una banda delle dimensioni attese di circa 300 bp), quindi questo prodotto di PCR è purificato (paragrafo 3.9) e clonato (paragrafi 3.11 e 3.12).

CHS deg FOR2	5' AARGCBATHAARGARTGGGG 3'
CHS deg REV1	5' CCRTCDCCCRAAVAGNGCTTG 3'

6.10 FITOENE SINTASI DI *Ginkgo biloba*

a. Sequenza nucleotidica

ATGGATCTGAGGAAGTCACGTTACAAGA ACTTCGACGAGCTCTATCT
TTACTGCTATTATGTAGCTGGGACAGTAGGATTGATGAGTGTTCCCTG
TAATGGGTATTGCAATGGACTCACAAGCAACAACAGAAAGTGTTTAC
GGTGCTGCCTTAGCTTGGGCATTGCAAATCAGCTAACAAACATATT
CCGAGATGTTGGTGAAAGGGCGAATT

b. Sequenza aminoacidica dedotta

MDLRKSR YKNFDELYLYCYVAGTVGLMSVPVMGIAMDSQATTESVYG
AALALGIANQLTNIFRDVGERAN

Allegato 6.10: Fitoene sintasi di *Ginkgo biloba*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con gli oligonucleotidi riportati in seguito è stata allestita una PCR a gradiente usando come template il cDNA derivante dall'RNA della polpa del 29/08/06, utilizzando quattro temperature diverse: 48, 50, 52, 54 °C. Tutte le reazioni hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (circa 220 bp). Si è deciso quindi

di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 54°C.

PSY deg FOR2	5' ATGATHGARGGVATGMKDATGGA 3'
PSY deg REV1	5' TCWCCDACATCHCKNARTATRTT 3'

6.11 FITOENE SINTASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

AATTCGCCCTTTCACCGACATCACGGAATATATTGGTAAGCTGATTTG
 CAATTCCCAAAGCTAATGCAGCATTGTACACGCTTTCTGTTGTTGCTT
 GGGATTCTG **GCGCAATACCCATTACAGGAACA**CTCATCAATCCA
 ACTGTGCCAGCAACATAATAGCAGTAAAGATAGAGCTCGTCAAACCCCTT
 GTAACGAGGCTTCCTCAGATCCATTCTCATAC **CCTCAATCATACCC**
TAAATGGCTGGATGTCAACAGGAAATTTGCAACTGTATCTGATAAA
 GCCGCATCAAGCGTGTGCATATGGACTACTGTTAAAGAGGTCCTCTAG
 CCTTTTTTCCCATCGATCTAGTGCCTTTGGTGTGATGTGTGAAGCATT
 AGGACCATCTACAAGTTCATCAGTCCTCCTGCACCACACATATATTG
 CCCAAAGGGC

b. Sequenza aminoacidica dedotta

ALWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPKALDRWEKRLEDLFNSSPYDTLD
 AALSDTVAKFPVDIQPFGRMIEGMRMDLRKPRYKGFDELYLYCYVAG
 TVGLMSVPVMGIAPESQATTESVYNAALALGIANQLTNIFRDVGERAN

Allegato 6.11: Fitoene sintasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Con gli oligonucleotidi riportati di seguito è stata allestita una PCR a gradiente alle temperature di annealing di 48, 50, 52 e 54°C utilizzando cDNA di tasso breaker 2, stadio di sviluppo in cui l'arillo ha già cominciato ad assumere una colorazione arancio-rossa. Tutte le reazioni hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (circa 400 bp). Si è deciso quindi di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 54°C.

PSY_deg_for1	5' TGGGCWATMTATGTDGTTGGTG 3'
PSY_deg_rev1	5' TCWCCDACATCHCKNARTATRRTT 3'

6.12 SAM SINTETASI DI *Ginkgo biloba*

a. Sequenza nucleotidica

GATCAGGGTCACATGTTTTGGGTATGCAACTGATGAGACCCCAGAGC
 TTATGCCTCTAACTCATGTTTTGGCCACAAAGCTTGGAGCCAAGCTT
 ACTGAAGTCAGAAAGAATGGAACCTGCCCATG**GTTGAGGCCTGATG**
GGAAGACCCAAGTGACTATTGAGTATAGAAATGAAGGAGGTGCCAT
 GGTTCCCTCAACGTGTTCCACACCGTTCTTATTTCCACTCAGCATGATGA
 GACTGTTACCAATGACCAGATTGCTGCTGATTTG**AAGGAGCATGTGA**
TCAAGCCTGTGATTCCAGAGAAATACTTGGACGAGAACACCATTTTC
 CACTTGAATCCCTCTGGCAGATTTGTGATTGGAGGGCCTCATGGAGA
 TGCGGGTCTGACTGGCAGGAAGATCATCATTGACACCTATGGTGGA
 TGGGGAGCACACGG

b. Sequenza aminoacidica dedotta

DQGHMFGYATDETPELMPLTHVLATKLGAKLTEVRKNGTCPWLRPDGK
TQVTIEYRNEGGAMVPQRVHTVLISTQHDETVTNDQIAADLKEHVIKPMI
PEKYLDENTIFHLNPSGRFVIGGPHGDAGLTGRKIIIDTYGGWGAH

Allegato 6.12: SAM sintetasi di *Ginkgo biloba*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Gli oligonucleotidi riportati di seguito sono stati usati per allestire una PCR a gradiente alle temperature di annealing di 54, 56, 58, 60 °C. Si è utilizzato il cDNA proveniente dalle polpe del 19/7/06 e del 1/8/06. Le reazioni che hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (circa 450 bp) sono state quelle effettuate a 58 e 60°C. Si è quindi deciso di procedere con la purificazione (paragrafo 3.9) e il clonaggio (paragrafi 3.11 e 3.12) del prodotto di PCR della polpa del 19/7/06 a 60°C.

SAM_for1_deg	5' ATTGGWGCHGGHGAYCARGG 3'
SAM_rev_deg	5' CCDCCWCCRTGDGCWCCCCA 3'

6.13 SAM SINTETASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

GGTCACATGTTTGGCTATGCCACTGATGAGACTCCTGAGCTCATGCC
TCTCACTCATGTTCTGGCCACGAAGCTCGGTGCCAAGCTTACTGAGG
TCAGAAAG **AATGGTACTTGCCCCTGGTTGAGG** CCGATGGCAAAC
CCAGGTCACCATYGAGTATAGAAATGAAGGAGGAGCCATGGTTCCT
GAACGGGTGCACACTGTTCTCATATCCACTCAGCATGATGAGAC **TGT**
CACCAACGACCAGATTGCTGC TGATCTCAAGGAGCATGTCATCAAGC
CTGTGATTCCAGAGAARTACCTTGATGAGAACACTATCTTCCATCTGA
ACCCATCAGGGAGATTTGTGATAGGAGGGCCACATGGAGATGCAGG
TCTCACTGGCAGGAAGATTATTATTGACACATATGGGGGTTGG

b. Sequenza aminoacidica dedotta

GHMFGYATDETPELMPLTHVLATKLGAKLTEVRKNGTCPWLRPDGKTQ
VTIEYRNEGGAMVPERVHTVLISTQHDETVTNDQIAADLKEHVIKPIPE
KYLDENTIFHLNPSGRFVIGGPHGDAGLTGRKIIIDTYGGW

Allegato 6.13: SAM sintetasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Per isolare la SAM sintetasi di tasso sono stati utilizzati gli stessi oligonucleotidi usati per il ginkgo (allegato 6.12). L'esperimento, usando cDNA di tasso allo stadio breaker 1 e breaker 2, è stato condotto alle temperature di annealing di 54, 56, 58 e 60°C. Il risultato migliore è stato ottenuto nella reazione a 60°C

Allegati

utilizzando come stampo il cDNA breaker2. Per questo motivo sono stati purificati (paragrafo 3.9) e clonati (paragrafi 3.11 e 3.12) questi prodotti di PCR.

6.14 ACC OSSIDASI DI *Ginkgo biloba*

a. Sequenza nucleotidica

```
ATTCGCCCTTGGGTTGTAAAAGGATGCCACTGACCTTCGAGTGCCAT  
TTTCATTAGGCAGCACACGATGCCATGCGCTCTTATATCTACCATTG  
CTAATCGCCTCCAACCTGATCACCAATGTCAATAACAATTGCGTTGGG  
CATTGGTTGTACATCGAACCAATGACCATCCTTGAGGACCTGAAGAC  
CGGCTACTTCATCATCTTGATACAGCAGAATGA
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
ILLYQDDEVAGLQVLKDGHWFDVQMPNAIVIDIGDQLEAISNGRYKSA  
WHRVLPNENGTRRSVASFYNPRAN
```

Allegato 6.14: ACC ossidasi di *Ginkgo biloba*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Gli oligonucleotidi utilizzati per isolare un frammento del cDNA di ACC ossidasi di ginkgo sono riportati di seguito. Con questi sono state allestite una serie di reazioni di PCR a gradiente alle temperature di 48, 50, 52, 54°C utilizzando come stampo il cDNA delle polpe del 16/6/06 e del 1/08/06, stadi in cui inizia il processo di maturazione. Si è ottenuto una banda delle dimensioni attese molto

Allegati

debole solo nel campione a 54°C della polpa 1/08/06; si è quindi preferito riamplicare 2 µL di questo prodotto di PCR utilizzando delle temperature di annealing più elevate (52, 54, 56 e 58°C) per favorire un appaiamento più specifico. Tutte le reazioni hanno dato l'amplicato delle dimensioni attese (circa 250 bp). Si è quindi deciso di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) i prodotti di PCR a 54°C.

ACO_deg_for1	5' CAYACHGAYGCHGGHGGBVTCAT 3'
ACO_deg_rev1	5' GGRTTRTARAANGAWGC 3'

6.15 ACC OSSIDASI DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

```
CGGGGTCATTCTTTTATACCAAGACGACGAGGTTCCGGGGCTTCAG  
GTGCTCGACAATGGCAGATGGATCGGCGTACAACCGCTGCGATATT  
CAATTGTTGTCAACACGGGAGATCAGTTGGAAGCAGTGAGCAACGG  
GAAATACAAGAGCGCGTGGCATCGAATTCTGCCACAAATAATGGCA  
ATCGTTTGTGTCAGTGGCATCGTTCTACAACCCAAGGGCGAATT
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
GVILLYQDDEVPLQVLDNNGRWIGVQPLRYSIVVNTGDQLEAVSNGKY  
KSAWHRILPTNNGNRLSVASFYNPRAN
```

Allegato 6.15: ACC ossidasi di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato

Allegati

l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Gli stessi oligonucleotidi utilizzati per isolare l'ACO di ginkgo (allegato 6.14) sono stati testati anche sul cDNA di tasso breaker1 e breaker2 preparando una PCR a gradiente alle temperature di annealing di 48, 50, 52 e 54°C. Poiché solo il campione breaker2 a 52°C presentava una banda delle dimensioni attese (200-250 bp) ma poco visibile, sono stati utilizzati 2 µL di prodotto di PCR per riamplicare mediante un'ulteriore PCR gradiente, applicando temperature di annealing più elevate (52, 54, 56 e 58°C) in modo tale da avere una maggiore specificità nell'appaiamento degli oligonucleotidi. Tutte le reazioni hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (circa 250 bp), quindi si è deciso di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) i prodotti di PCR a 58 °C.

6.16 RECETTORI PER L'ETILENE DI *Taxus baccata*

a. Sequenza nucleotidica

```
GAACTTCACAGCATTCCCTACCACATTCAATACAATTTGCATAAGACG
TTTTTCGTCACCAACAGCATACCC TGGTAGGTCTGGGGCCAGCGTCA
TTGACACTGACAACCTTCTTCACGGAAGTGATAGGCTTTACAAGATTAT
GAACCTCATGAAACAAAGCAGGAAGATTAATTTCCG AATGTTGAGT
TCCAGGCTTCCGTC CTCAAGCCTAGAAAGATCCAAAACATCATTAAAG
GGCG
```

b. Sequenza aminoacidica dedotta

```
ALNDVLDLSRLEDGSLELNIRKFNLPALFHEVHNLVKPITSVKKLSVSMT
LAPDLPGYAVGDEKRLMQIVLNVVGNVAVKF
```

Allegati

Allegato 6.16: Recettori per l'etilene di *Taxus baccata*. In (a) la sequenza nucleotidica. Sono evidenziate le regioni, dove sono stati progettati gli oligonucleotidi per la Real time PCR. In azzurro è segnato l'oligonucleotide forward; in verde è segnato l'oligonucleotide reverse. In (b) la sequenza aminoacidica dedotta.

Strategia di clonaggio

Utilizzando gli oligonucleotidi degenerati riportati di seguito è stata allestita una PCR a gradiente applicando quattro diverse temperature di annealing: 46, 48, 50 e 52°C. L'analisi è stata fatta su cDNA di tasso retrotrascritto da RNA di arillo rosso, stadio in cui è stata osservata una forte espressione di ACC ossidasi e quindi forte produzione di etilene. È stata ottenuta una banda delle dimensioni attese (circa 240 bp) nel prodotto di PCR a 48°C ma poiché la banda era molto debole, sono stati riamplicati 2 µL di questo campione tramite un'altra PCR a gradiente con temperature di annealing più alte: 48, 50, 54 e 56°C. Tutte le reazioni hanno dato la banda di dimensioni attese ma si è deciso di purificare (paragrafo 3.9) e clonare (paragrafi 3.11 e 3.12) il prodotto di PCR a 56°C in quanto presentava la banda più pulita.

ETR_deg_for2	5' AAYGATGTYYYTRGATCTTTC 3'
ETR_10	5' TTKGWGAAYTTYACAGCATT 3'

Bibliografia

7. BIBLIOGRAFIA

Alexander L., Grierson D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **53**: 2037-2055.

Ando S., Sato Y., Kamachi S., Sakai S. 2001. Isolation of a MADS-box gene (ERAF17) and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Planta* **213**: 943-952.

Baldwin E.A., Scott J.W., Shewmaker C.K., Schuch W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *Hort. Science.* **35**: 1013-1022.

Bowe L.M, Coat G., dePamphilis C.W. 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *PNAS* **97** (8): 4092-4097.

Brady C.J., MacAlpine G., McGlasson W.B., and Ueda Y. 1982. Polygalacturonase in tomato fruits and the induction of ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 171-178.

Brummell D.A., Harpster M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plant. *Plant Mol. Biol.* **47**: 311-339.

Carlsbecker A., Tandre K., Johanson U., Englund M., Engstrom P. 2004. The MADS-box gene DAL1 is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *The Plant J.* **40**: 546–557.

Celia Marin-Rodriguez M., Orchard J., Seymour G.B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* **53**: 2115-2119.

Chang S., Puryear J., Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* **11**: 113-116.

Cho S., Jang S., Chae S., Chung K.M., Moon Y-H., An G., Jang S.K. 1999. Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain. *Plant Mol. Biol.* **40**: 419-429.

Cosgrove D.J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**: 321-326.

De Folter S., Angenent C. 2006. *Trans* meets *cis* in MADS science. *Trends in Plant Science* **11** (5): 224-231.

Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H. 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* (19):5370-5379.

Fan J., Li W., Dong X., Guo W., Shu H. 2007. Ectopic expression of a hyacinth *AGL6* homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in *Arabidopsis*. *Sci. in China Press* **50** (5): 676-689.

Ferrández C. 2002. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **53**: 2031-2038.

Fulton T.M. , Chunwongse, J. and Tanksley, S.D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 207-209.

Futamura N., Totoki Y., Toyoda A., Igasaki T., Nanjo T., Seki M., Sakaki Y., Mari A., Shinozaki K., Shinohara K. 2008. Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC genomics.* **9**: 383-397.

Giovannoni J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**: S170-S180.

Hileman L.C., Sundstrom J.F., Litt A., Chen M., Shumba T., Irish V.F. 2006. Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 2245-2258.

Honma T., Goto K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-529.

Hsu H.F., Huang C.H., Chou L.T., Yang C.H. 2003. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell Physiol.* **44**(8): 783-794.

Immink R.G.H., Kaufmann K., Angenent G.C. 2010. The 'ABC' of MADS domain protein behaviour and interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**: 87-93.

Itkin M., Seybold H., Breitel D., Rogachev I., Meir S., Aharoni A. 2009. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The plant Journal*, **60**: 1081-1095.

Ito Y., Kitagawa M., Ihashi N., Yabe K., Kimbara J., Yasuda J., Ito H., Inakuma T., Hiroi S., Kasumi T. 2008. DNA- binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *The Plant Journal*, **55**: 212-223.

Jiménez-Bermúdez S., Redondo-Nevado J., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L., Lopez-Aranda J.M., Valpuesta V., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A., José A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of pectate lyase gene. *Plant Physiol.* **128**: 751-759.

Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R.G., Last R.L. 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**:171-179.

Lovisetto A. 2007. Geni ortologhi di AGAMOUS sono espressi nelle strutture carnose che accompagnano i semi di *Taxus baccata* e *Ginkgo biloba*. Tesi di Laurea dell'Università di Padova.

Lui Y., Hoffman N.E., Yang S.F. 1985. Promotion by ethylene of the capacity to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimateric tomato and cantaloupe fruit. *Plant Physiol.* **77**: 407-411.

Melzer R., Wang Y.Q., Theissen G. 2010. The naked and the dead: the ABCs of Gymnosperm reproduction and the origin of the Angiosperm flower. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**: 118-128.

Mouradov A., Glassick T.V., Hamdorf B.A., Murphy L.C., Marla S.S., Yang Y., Teasdale R.D. 1998. Family of MADS-Box genes expressed early in male and female reproductive structures of monterey pine. *Plant Physiol.* **117**: 55-62.

Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Stewart A.J., Jenkins G.I., Caboche M., Lepiniec L. 2002. The TRANSPARENT TESTA16 Locus Encodes the

Bibliografia

Arabidopsis Bister MADS Domain Protein and Is Required for Proper Development and Pigmentation of the Seed Coat. *The Plant Cell* **14**: 2463–2479.

Payasi A., Mishra N.N., Chaves A.L.S., Singh R. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **15** (2): 103-113.

Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.F. 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**: 200-203.

Pellegrini L., Tan S., Richmond T.J. 1995. Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature*. **376**: 490- 498.

Pnueli L., Abu- Abeid M., Zamir D., Nacken W., Schwarz-Sommer Z., Lifschitz E. 1991. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J* **1**:255-266.

Pnueli L., Hareven D., Rounsley S.D., Yanofsky M.F., Lifschitz E. (1994 b) Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*. **6** (2):163-73.

Raven P.H., Evert R.F., Eichorn S.E. 2002. *Biologia delle piante*. Sesta edizione. Zanichelli.

Riechmann J.L., Krizek B.A., Meyerowitz E.M. 1996. Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4793- 4798.

Saitou N., Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method- a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol* **4**: 406-425.

Salisbury F.B., Ross C.W. 1978. *Plant Physiology*. Second edition. Wadsworth Publishing Company.

Seymour G.B., Ryder C.D., Cevik V., Hammond J.P., Popovich A., King G.J., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Manning K. 2011. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*FragariaXananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J. Exp. Bot.* **62** (3): 1179-1188.

Shindo S., Ito M., Ueda K., Kato M., Hasebe M. 1999. Characterization of MADS genes in the Gymnosperm *Gnetum parvifolium* and its implication on the evolution of reproductive organs in seed plants. *Evol. Dev.* **1**: 180-190.

Shore P., Sharrocks A.D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem* **229**: 1-13.

Sitrit Y., Bennett A.B. 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. *Plant Physiol.* **116**: 1145-1150.

Soltis D.E., Ma H., Frohlich M.W., Soltis P.S., Albert V.A., Oppenheimer D.G., Altman N.S., dePamphilis C., Leebens-Mack J. 2007. The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression. *Trends in Plant Science* **12** (8): 358-367.

Spena A., Rotino L. 2001. Parthenocarpy. State of the Art. Pages 435-450 In: *Current Trends in the Embryology of Angiosperms* (Bhajwani S.S. and Soh W.Y. Eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Tadiello A., Pavanello A., Zanin D., Caporali E., Colombo L., Rotino G.L., Trainotti L., Casadoro G. 2009. A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *J. Exp. Bot.* **60**: 651-661.

Taiz L., Zeiger E. 2009. *Fisiologia vegetale*. Terza edizione. Piccin Nuova Libreria.

Tandre K., Svenson M., Svensson M.E., Engström P. 1998. Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J.* **15**: 615-623.

Taylor T.N., Taylor E.L., Krings M. 2009. *Paleobotany*. The biology and evolution of fossil plants. Second edition. Academic Press: pp1230.

Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr. Op. Plant Bio.* **4**: 75-85.

Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J.T., Münster T., Winter K.U., Saedler H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **42**: 115-149.

Theissen G., Kim J.T., Saedler H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **43**: 484-516.

Theissen G., Saedler H. 2001. Plant biology: floral quartets. *Nature* **409**: 469-471.

Vrebalov J., Pan I., Arroyo A.J.M., McQuinn R., Chung M., Poole M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J., Irish V.F. 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *The Plant cell*, **21**: 3041-3062.

Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Mediano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**: 343-346.

Wang Y.Q., Melzer R., Theissen G. 2010. Molecular interactions of orthologues of floral homeotic proteins from the gymnosperm *Gnetum gnemon* provide a clue to the evolutionary origin of 'floral quartets'. *The Plant J.* **64**: 177-190.

Winter K.U., Becker A., Munster T., Kim J.T., Saedler H., Theissen G. 1999. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 7342-7347.

Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.

Zhang P., Tan H.T.W., Pwee K.H., Kumar P.P. 2004. Conservation of class C function of floral organ development during 300 million years of evolution from gymnosperms to angiosperms. *The Plant J.* **37**: 566-577.

Zhou Z.Y. 2009. An overview of fossil Ginkgoales. *Paleoworld* **18**: 1-22.

Ringraziamenti

Ed eccomi qui a scrivere l'ultima pagina della mia tesi di dottorato, chi l'avrebbe mai detto il 1° gennaio 2008 che sarebbe arrivato questo momento? Di certo non sono stati tre anni facili e da solo non sarei mai riuscito a portarli a termine.

Grazie ai miei genitori per avermi sostenuto e appoggiato durante tutto il mio periodo di studi e in particolare durante questi tre anni.

Grazie al Professor Casadoro, non solo per avermi permesso di svolgere la tesi nel suo laboratorio, ma, soprattutto, perché ho imparato molto dalla sua "scuola di vita". In particolare un grazie per avermi insegnato a perseguire con costanza e impegno gli obiettivi senza abbattermi di fronte alle prime difficoltà.

Un enorme e sincero GRAZIE a Nicola per avermi sopportato, aiutato, ascoltato e consigliato quando mi lamentavo di fronte ai problemi che incontravo ogni giorno. Per me sei stato e sarai il fratello maggiore che non ho mai avuto.

Grazie a Valeria per gli innumerevoli venerdì e sabati sera, soprattutto in quest'ultimo anno, passati ad ascoltarmi e a consigliarmi.

Grazie, anzi mille volte grazie ad Anna per avermi sempre aiutato nonostante la non più giovane età (sto scherzando non cestinare la tesi ti prego!!). Grazie soprattutto per avermi insegnato che si può essere professionali e lavorare bene anche con il sorriso e l'allegria. Ci ho messo un po' a capirlo ma poi è diventato più bello venire in laboratorio la mattina. E' un insegnamento fondamentale per qualsiasi lavoro farò da "grande".

Alice che dire? Senza il tuo aiuto le 100 pagine precedenti non ci sarebbero mai state. Un sincero grazie per avermi spiegato, aiutato e consigliato in questi anni nonostante tutti gli ostacoli e le difficoltà che hai avuto. La tua forza d'animo e il tuo impegno sono stati un esempio per me.

Grazie ai ragazzi che hanno fatto la tesi con me (Nicola, Alessandro, Roberta, Silvia) per avermi sopportato (spesso non è stato facile) e aiutato. Questo lavoro è anche merito vostro.

Grazie a tutti i ragazzi e ragazze che sono passati o sono attualmente in laboratorio per le risate e i momenti di allegria che hanno raddrizzato le giornate peggiori.

Grazie a tutti gli abitanti del 5° piano Sud per i consigli e i reagenti vari che di tanto in tanto chiedevo in prestito.

Infine un grazie a tutti quelli che non credevano in me, che negli anni mi hanno ostacolato o rallentato perché così mi avete spronato a dare il meglio di me stesso.

