



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

---

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI  
INDIRIZZO AGROBIOTECNOLOGIE - CICLO XXI**  
Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

***LA RISPOSTA ALLO STRESS DA FREDDO  
IN *Beta vulgaris*  
STUDIO DELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Andrea Battisti

**Supervisore :** Dr. ssa Serena Varotto

**Co-supervisore :** Dr. Giuseppe Mandolino

**Dottorando :** Dr.ssa Daniela Pacifico

DATA CONSEGNA TESI

01 febbraio 2010

## **Declaration**

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

(signature/name/date)

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

## **Dichiarazione**

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

(firma/nome/data)

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

## **Indice**

<b>Indice</b> .....	<b>2</b>
<b>Ringraziamenti</b> .....	<b>5</b>
<b>Riassunto</b> .....	<b>6</b>
<b>Summary</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>12</b>
1.1 <i>Barbabietola da zucchero</i> .....	12
1.1.1 <i>Le condizioni climatiche ottimali</i> .....	15
1.1.2 <i>Il genoma</i> .....	16
1.2 <i>Stress abiotici</i> .....	18
1.2.1. <i>La risposta delle piante alle basse temperature</i> .....	18
1.2.2. <i>La risposta della barbabietola alle basse temperature</i> .....	21
1.2.3. <i>La misura del danno da basse temperature</i> .....	22
1.3 <i>Qualità e resa in saccarosio (CSY, Corrected Sucrose Yield)</i> .....	24
1.4 <i>Le nuove tecnologie nell'analisi del trascrittoma</i> .....	26
1.4.1 <i>Le nuove frontiere della bioinformatica: le analisi in silico ad</i> <i>integrazione delle analisi in lab</i> .....	26
1.4.1.1 <i>ESTs (Expressed Sequence Tags): applicazioni e limiti</i> .....	27
1.4.1.2. <i>TIGR: Gene Index database e Assembly Process</i> .....	29
1.4.2 <i>Real Time PCR</i> .....	32
1.4.2.1 <i>Basi teoriche e tecniche</i> .....	32
1.4.2.2 <i>"Reference Gene Selection" (R.G.S.)</i> .....	36
1.4.3 <i>cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)</i> .....	37
<b>2. Materiali e metodi</b> .....	<b>40</b>
2.1. <i>Materiale vegetale</i> .....	40
2.2 <i>Trattamento delle piante con basse temperature</i> .....	43
2.3 <i>Valutazione del danno da freddo</i> .....	45
2.3.1 <i>Sopravvivenza</i> .....	45

2.3.2 EL (Electrolyte Leakage) Test .....	45
2.4 <i>Analisi della modulazione genica mediante real-time PCR</i> .....	48
2.4.1 <i>Analisi bioinformatica</i> .....	48
2.4.2 <i>Disegno dei saggi real-time PCR</i> .....	50
2.4.3 <i>Estrazione RNA totale</i> .....	51
2.4.4 <i>"Two-steps" real-time PCR</i> .....	52
2.4.5 <i>"Reference Gene Selection"</i> .....	54
2.4.6 <i>Quantitativa relativa nell'analisi della modulazione dell'espressione di alcuni geni di interesse legati al carattere CSY</i> .....	56
2.5. <i>Analisi del trascrittoma mediante cDNA-AFLP</i> .....	57
2.5.1. <i>Estrazione RNA totale</i> .....	57
2.5.2 <i>Isolamento dell'RNA messaggero e Retro-trascrizione</i> .....	59
2.5.3 <i>Protocollo cDNA AFLP</i> .....	60
2.5.4 <i>Eluizione delle bande</i> .....	64
2.5.5 <i>Clonaggio</i> .....	66
2.5.6 <i>Sequenziamento</i> .....	67
2.5.7 <i>Analisi delle sequenze</i> .....	68
2.6. <i>Analisi dei metaboliti</i> .....	71
2.6.1 <i>Analisi del contenuto in carboidrati</i> .....	71
2.6.2 <i>Analisi del metaboloma</i> .....	72
<b>3. Risultati e discussione</b> .....	<b>73</b>
3.1 <i>Valutazione del danno da basse temperature</i> .....	73
3.2 <i>Analisi della modulazione dell'espressione di geni di interesse in seguito al trattamento con le basse temperature</i> .....	76
3.2.1 <i>Validazione dei Tentative Consensus e dei saggi real-time PCR</i> .....	76
3.2.2 <i>"Reference gene selection"</i> .....	80
3.2.2.1 <i>R.G.S. in organi differenti in condizioni di controllo</i> .....	80
3.2.2.2 <i>R.G.S. in organi differenti sottoposti a trattamento termico</i> ..	82
3.2.3 <i>Espressione organo-specifica dei geni oggetto di studio</i> .....	86

3.2.4	<i>Profili di espressione genica di geni oggetto di studio in seguito allo stress da basse temperature</i>	88
3.3	<i>Analisi dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti tramite approccio ad ampio spettro</i>	97
3.3.1	<i>Caratterizzazione della libreria cDNA e sequenziamento dei TDFs (Transcript-Derived Fragments)</i>	97
3.3.2	<i>Analisi dei dati cDNA-AFLP e classificazione funzionale dei TDFs ottenuti</i>	102
3.4	<i>Analisi del contenuto in metaboliti in risposta alle basse temperature</i>	112
<b>4.</b>	<b><i>Conclusioni</i></b>	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b><i>Allegati</i></b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b><i>Bliografia</i></b>	<b>149</b>

## **Ringraziamenti**

*Rivolgo questi ringraziamenti a tutti coloro che, in vari modi, hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi di dottorato.*

*Un primo e particolare ringraziamento va al Dr. Giuseppe Mandolino, senza il quale questo lavoro non sarebbe stato possibile, per il supporto che mi ha da dato in tutti questi anni e per la lettura critica della tesi finale.*

*Ringrazio con affetto anche la dr.ssa Chiara Onofri e Rossano Clementi che con la loro presenza e competenza hanno fornito un prezioso aiuto tecnico, oltre che morale.*

*Un particolare riconoscimento va al progetto “Agronanotech”, nella persona del Prof. Luigi Frusciante, per il supporto ricevuto.*

*Con altrettanta gratitudine, ringrazio anche la dr.ssa Serena Varotto, il dr. Paolo Ranalli e il dr. Valentini.*

*A tutti miei colleghi va inoltre un sentito ringraziamento, soprattutto alla dr.ssa V.M.C. Moliterni, alla dr.ssa Anna Moschella e alla dr.ssa Paola Vastarelli.*

*Infine, dedico la mia tesi a Matteo e alla mia famiglia per la dedizione e il conforto che mi hanno sempre dimostrato.*

## **RIASSUNTO**

Il lavoro di tesi è stato svolto presso il Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per le Colture Industriali (C.R.A.-C.I.N., Bologna), impegnato da diversi anni in attività di ricerca per il miglioramento genetico di barbabietola da zucchero per l'ottenimento di genotipi resistenti agli stress osmotici, quali lo stress idrico e il freddo. Nell'ambito dei progetti "Agronanotecnologie" e "Agronanotecnologie II" è stato possibile affiancare al miglioramento genetico classico, nuove tecnologie molecolari, le biotecnologie.

Ai fini del miglioramento genetico per l'aumento dell'adattabilità all'ambiente mediterraneo, abbiamo studiato la risposta allo stress da freddo in varietà commerciali (sia a semina precoce primaverile sia a semina autunnale) di *Beta vulgaris*, da un punto di vista molecolare, fisiologico e metabolico, con una particolare attenzione alle vie metaboliche che controllano la sintesi di saccarosio e la sua ripartizione fra gli organi della pianta.

L'approccio "dry/wet", ovvero l'integrazione di analisi sperimentali "high-throughput" del trascrittoma che consentono di ottenere una elevata quantità di dati in tempi ridotti e di analisi bioinformatiche, rappresenta oggi la strategia di eccellenza per investigare la risposta molecolare della specie di interesse.

Lo scopo principale è stato quello di comprendere i meccanismi molecolari alla base della risposta alle basse temperature sia tramite un'analisi della modulazione dell'espressione genica di specifici geni *target* legati al carattere di maggior interesse in questa specie, ovvero la qualità e la resa in saccarosio (CSY, Corrected Sucrose Yield), sia tramite analisi ad ampio spettro mediante la tecnica cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), per identificare sequenze la cui espressione risulti modulata dalle basse temperature. Questo lavoro ha permesso di individuare nuove sequenze reponsive al freddo, e di studiare le differenze comportamentali, da un punto di vista molecolare e fisiologico, tra varietà selezionate per areali climatici differenti.

L'attività di ricerca svolta può essere riassunta nelle seguenti fasi:

1. Un'indagine preliminare sulla cv. Bianca e sulla cv. Franca ha permesso di verificare la diversa tolleranza al freddo delle due varietà, stabilendo, sulla base sperimentale, la temperatura di trattamento ideale, ovvero tale da garantire che lo stress venga percepito dalla pianta ma che non risulti letale, in modo tale da consentire le successive analisi di espressione.

2. Prima di determinare le variazioni dei livelli di trascritti tramite PCR quantitativa relativa, è stata condotta una selezione dei "geni di riferimento", denominati comunemente *reference* o *housekeeping*, necessaria per una normalizzazione accurata e precisa dei dati; ed è stato inoltre dimostrato che la normalizzazione su *reference* inappropriati risulta in una quantificazione errata. La valutazione di 7 geni comunemente impiegati come *reference* in altre specie, condizioni sperimentali e organi, ha permesso di identificare l'rRNA 18S e la tubulina come i migliori per

analisi di espressione relativa condotte tra organi diversi messi a confronto (foglia, radice e cotiledone) e l'rRNA 5S e la tubulina per analisi su foglia di plantule trattate vs. controllo; allo stesso modo, è stato individuato l'elongation factor 1  $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) come migliore *reference* in radice.

3. Dopo aver valutato il livello dei trascritti relativi a due geni noti per “rispondere” a livello di espressione a stress di tipo osmotico (DREB2A e colina mono-ossigenasi), le indagini successive hanno riguardato la modulazione dell'espressione di 10 geni di interesse correlati al metabolismo degli zuccheri. I risultati evidenziano una risposta scalare nel tempo e differenziale nelle due cultivar prese in esame, e suggeriscono la fruttosio 1,6 bifosfatasi citosolica come nodo regolativo, almeno a livello di espressione, delle differenti risposte delle due cultivar. E' infatti possibile che ad una migliore performance dopo l'esposizione alle basse temperature sia legata la capacità di convogliare il flusso dei carboidrati verso il metabolismo energetico piuttosto che verso l'accumulo in saccarosio.

4. L'analisi di espressione organo-specifica dei geni oggetto di studio in foglia e/o in radice è stata inoltre valutata, indicando che la maggior parte di essi ha un'espressione differenziale in uno dei due organi.

5. E' stata realizzata una libreria di sequenze di *Beta vulgaris* ottenuta, tramite cDNA-AFLP, dalle sequenze modulate dall'esposizione alle basse temperature di plantule di bietola in coltura idroponica (0°C e -2°C) in diversi organi (foglia e radice). 257 sequenze TDFs (Transcript-Derived Fragments) uniche (*unigenes*), putativamente coinvolte nella risposta alle basse temperature, sono state identificate e, attraverso una ricerca per similarità di sequenza, caratterizzate da un punto di vista funzionale. La suddivisione in categorie funzionali ha consentito di stimare quali fossero i processi biologici e molecolari più coinvolti in tale risposta sia in foglia sia in radice. Il 47% delle sequenze risultano comunque sconosciute, in quanto non trova alcuna similarità in banca dati, o trova similarità con sequenze codificanti proteine a funzione non nota.

6. Al fine di verificare un'eventuale corrispondenza tra la modulazione dei geni analizzati e variazioni nel contenuto in metaboliti, un'analisi del profilo metabolico dei carboidrati è stato condotto tramite HPLC-ELSD (High Performance Liquid Chromatography- Evaporative Light Scattering Detector). Inoltre, tramite un'analisi ad ampio spettro <sup>1</sup>H-HRMAS-NMR (High Resolution Magic Angle Spinning- Nuclear Magnetic Resonance) sono stati rilevati i cambiamenti relativi a più classi metaboliche contemporaneamente.

Nella fase iniziale e in quella conclusiva di questo lavoro, l'integrazione delle analisi di espressione con un lavoro *in silico* ha consentito di operare nonostante la mancanza di estesi dati di sequenza in *Beta vulgaris*, che avrebbe rappresentato un importante limite al proseguimento dell'attività di ricerca. Inizialmente, una ricerca sul sito BvGI database (TIGR, *Beta vulgaris* Gene Index) ha fornito le sequenze Tentative Consensus (TC), ovvero trascritti virtuali ad alta fedeltà,

relative a funzioni geniche di nostro interesse per le quali non è nota la sequenza genica completa. Sulla base di queste sequenze sono stati costruiti 19 saggi utilizzati per le indagini real-time PCR successive. A seguito dell'analisi cDNA-AFLP, è stato, inoltre, possibile attribuire a TDFs a funzione sconosciuta una collocazione sui TCs disponibili in banca dati per i quali, nella maggior parte dei casi, è stato possibile predire un'annotazione funzionale.

Complessivamente, i risultati ottenuti indicano che la barbabietola da zucchero sottoposta alle basse temperature subisce dei profondi cambiamenti a livello di espressione genica, che coinvolgono prevalentemente la fotosintesi, il metabolismo dei carboidrati e il metabolismo degli amminoacidi. In alcuni casi, tali variazioni possono risultare fissate nel tempo, come per la fruttosio 1,6 bifosfatasi, ma non si riflettono, almeno apparentemente, su significative variazioni nel contenuto di carboidrati. Al contrario, il metabolismo degli amminoacidi sembra invece coinvolto sia a livello di trascritti sia a livello di metaboliti.

Oltre che migliorare la conoscenza molecolare della risposta della barbabietola da zucchero a stress abiotici e rendere possibile un suo confronto con la specie modello *Arabidopsis thaliana*, l'analisi di trascritti genici modulati da stress osmotici consentirà di individuare gli eventuali geni correlabili con una maggiore adattabilità o resistenza, che a loro volta potrebbero risultare un valido strumento d'identificazione precoce, tramite selezione assistita da marcatori (MAS), durante il *breeding* per il miglioramento genetico varietale. Questo potrebbe consentire l'ottenimento di sensibili aumenti qualitativi e produttivi con ridotto impiego di tempi e costi.

## Summary

The experimental part of this dissertation was performed in the institute of Agricultural Research Council - Research Institute for Industrial Crops (C.R.A.-C.I.N., Bologna). This institute is involved since long time in many research projects dealing with the breeding of Sugar Beet, specifically oriented towards the creation of genotypes resistant to osmotic stresses, as drought and cold stress.

In this study, classical breeding techniques were integrated with new molecular techniques, in the frame of two specific projects “Agronanotech” and “Agronanotech II”.

With the main aim to improve the genetic adaptation of Sugar Beet to the dry Mediterranean climate, we studied the response of different cultivated accessions of *Beta vulgaris* (with both spring early sowing and autumnal late sowing) to cold stress, employing molecular, physiological and metabolic approaches and focusing specifically on metabolic pathways involved in the control of sucrose biosynthesis and distribution in the different tissues of the plant.

The employment of “dry/wet” strategies, where the integration of experimental analysis of “high-throughput” expression profiling leads to the achievement of an elevated amount of data with low costs and short time, supported by bioinformatic analyses, are the approaches of election used nowadays to investigate the molecular response of the species of interest.

The main purpose of this work was the investigation of the molecular mechanisms underlying the response to low temperatures both with a focused approach studying the modulation of the expression of specific target genes involved in determining trade-interesting characters as sucrose quality and yield and with a wider approach involving cDNA-AFLP analysis, in order to identify sequences whose expression was cold modulated. The results of this study lead to the identification of new cold responsive sequences and permitted to identify differences in the molecular and physiological responses between the two varieties (Bianca and Franca) selected to growth in different climatic areas.

The complete research activity can be summarized in the following steps:

1. A preliminary investigation on the two varieties Bianca and Franca was performed to verify their different tolerance to cold , identifying the ideal temperature to be used for the treatment and necessary for the stress to be perceived from the plants but not lethal, in order to allow the subsequent expression analyses.

2. An accurate selection of the reference genes, necessary for the normalization of the expression data, was carried out since the utilization of inappropriate reference genes results in incorrect interpretation of the expression data. The evaluation of 7 genes usually used as reference genes in other species, experimental conditions and plant organs showed the 18S and tubulin as the

most stable genes in inter-tissue analysis, 5S and tubulin the best ones in low temperature-treated leaves and EF1 $\alpha$  in low temperature-treated roots.

3. After the evaluation of the expression of two osmotic stress-regulated genes (DREB2A and CMO) in order to confirm that *Beta vulgaris* transcriptome was cold-stress responsive, other 10 genes involved in sugar metabolism were investigated. The modulation of the expression of these genes highlighted an increasing time-course response different in the two varieties examined and identified the cytosolic fructose 1,6 biphosphatase as a putative central regulative point. It is actually conceivable that a better plant performance after exposition to low temperatures is dependent on its ability to convey the carbohydrate flux towards energy metabolism rather than towards sucrose accumulation and storage.

4. The localization of the transcripts of the studied genes was evaluated in leaf and/or roots, showing differential expression for the majority of them in one of the two organs considered.

5. A library of sequences modulated by low-temperature (0°C and -2°C) exposition of *Beta vulgaris* leaf and root in hydroponic culture was achieved by cDNA-AFLP analysis. 257 unigenes putatively involved in the response to low temperatures were identified and annotated from a functional point of view, through a bioinformatic research based on sequence similarity. This functional classification has allowed to estimate which biological and molecular processes were mainly involved in the response to low temperatures both in leaf and root tissues and showed that 47% of the analyzed sequences either did not find any similarity in the databanks interrogated or found a similarity with sequences coding for proteins with unknown function.

6. At the end, in order to investigate the putative correlation between the gene expression profiling and the changes of metabolites level, a HPLC-ELSD analysis and a <sup>1</sup>H-HRMAS-NMR analysis were carried out.

The lack of extended sequence data on *Beta vulgaris* genome was overcome thanks to the integration of the expression analysis study with the *in silico* approach both in the initial and final phase of this research, allowing the complete development of the entire project.

In the initial phase, we identified different Tentative Consensus (TC) sequences of interest from the BvGI database (TIGR, *Beta vulgaris* Gene Index), which were then used to design 19 Real Time-PCR assays. While in the final phase, after cDNA-AFLP analysis, the functional annotation of the Transcript Differential Fragments (TDFs) identified, was possible thanks to the TC sequences available in online databanks.

In summary, the results collected showed that sugar beet plants grown at low temperatures underwent deep changes at the genetic expression level, involving mainly photosynthesis, carbohydrate and aminoacid metabolic processes. In some cases, such variations showed to be maintained in the time-course (as for fructose 1,6 biphosphatase), but they are not reflected, at least

apparently, by significant variation in the carbohydrate content. On the contrary, the amino acid metabolism seems to be affected at both transcription and metabolic levels.

In the future, the analysis of osmotic stress modulated transcripts will lead to a better understanding of the molecular response of sugar beet to abiotic stresses, also in comparison to the model species *Arabidopsis*. Moreover, it will identify putative genes correlated with stress resistance and adaptation, which might be useful as adaptive characters to be selected during breeding cycles, in Marker Assisted Selection (MAS), hopefully achieving in this way an evident increase in crop quality and yield.

## 1. Introduzione

### 1.1 Barbabietola da zucchero

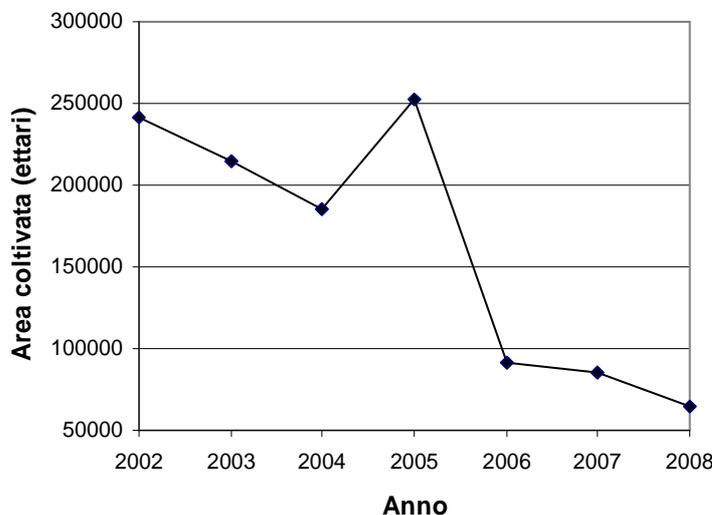
La barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris* L.) appartiene alla classe delle Dicotiledoni, ordine Centrospermae, famiglia Chenopodiaceae. La famiglia delle Chenopodiaceae comprende piante erbacee con struttura a rosetta ed *habitus* eretto-procombente o procombente, annuali, biennali o perenni, prevalentemente alofite o xerofite, complessivamente appartenenti a 102 generi diversi, fra cui quello di maggiore rilevanza economica è il genere *Beta*. Nel 1762, il genere *Beta* è stato diviso nella specie selvatica (*Beta maritima*) e in quella coltivata (*Beta vulgaris*), che a sua volta si suddivide in diverse sottospecie: *vulgaris*, *cicla*, da foglia o da costa, *maritima* e *adanensis*, queste ultime due selvatiche e spontanee, tutte pienamente interfeconde fra loro ed in grado di dare ibridi fertili. La classificazione è stata poi soggetta a numerose revisioni (Frese *et al.*, 1999), ed oggi la sottospecie *Beta vulgaris ssp. vulgaris* comprende tutte le forme coltivate, mentre la *B. maritima* è stata declassata a sottospecie (*B. vulgaris ssp. maritima*), e comprende numerose forme selvatiche o “escape”, incroci cioè con bietola da seme che hanno dato luogo ad un “continuum” di tipi fra le diverse tipologie di specie coltivate e quelle selvatiche.

La barbabietola da zucchero è considerata, insieme al riso, frumento, mais e soia una delle grandi colture industriali, con una superficie di circa 7 milioni di ettari diffusa su 50 nazioni, producendo circa un quarto del fabbisogno mondiale di saccarosio (250 milioni di tonnellate di zucchero greggio; Schneider, 2002).

Solo nel 1600, l'agronomo francese Iver de Serres si accorse che alcuni tipi di bietola davano “un succo simile allo sciroppo di zucchero” (Sidersky, 1931) fino a quel momento estratto solo da canna da zucchero, ma solo l'inizio dell'800 crea il passaggio della bietola a coltura industriale per l'estrazione del saccarosio, grazie agli studi di Franz Carl Achard. L'industria saccarifera prese poi un decisivo impulso solo nel secolo successivo, permettendo all'Unione Europea, in particolare, di diventare tra i maggiori produttori ed esportatori mondiali di zucchero. Nel 1997 in Italia erano in funzione 23 zuccherifici con una produzione media giornaliera di 7000 t (dato del 1995) e con un'estensione di coltivazione di 260.000 ettari l'anno, con l'area più importante concentrata in Emilia, Veneto, Lombardia, Piemonte e Friuli.

La progressiva penalizzazione del panorama bieticolo italiano, a seguito della riforma europea dell'OCM nel 2006 (Organizzazione Comune di Mercato), e il significativo aumento dei costi energetici relativi al processo di trasformazione, ha provocato un sensibile decremento in termini di ettari coltivati e di produzione. L'area coltivata in Italia prima del 2006 superava i 250.000 ettari l'anno, nel 2007 è calata ad un terzo e nel 2008 di un ulteriore 30%, con la

conseguente chiusura di diversi zuccherifici che attualmente sono quattro, dopo l'ultima chiusura a Jesi (Marche), nel 2008 (figura 1.1).



**Fig.1.1-** Area coltivata a barbabietola da zucchero negli anni compresi tra il 2002 e il 2007 (fonte: FAOSTAT; FAO Statistics Division 2009 | 03 December 2009; Associazione Italiana Sementi: rapporto attività 2008 )

La barbabietola da zucchero è una pianta biennale, a differenza della sottospecie selvatica che è spesso annuale. A seconda dell'utilizzo da radice o da seme, la semina avviene a fine febbraio o inizio marzo, nel primo caso, o viene anticipata all'autunno per favorire la vernalizzazione necessaria per la fioritura a primavera dell'anno successivo. Le condizioni ideali di germinazione del glomerulo si hanno a temperature di circa 25°C ed umidità del suolo di circa il 50%. L'involucro esterno assorbe acqua che viene poi rilasciata gradualmente provocando il rigonfiamento del seme e la fuoriuscita della radichetta seguita dall'allungamento dell'epicotile dal quale si liberano i due cotiledoni che funzionano come foglie fino alla fuoriuscita delle prime due foglie vere. Durante il primo anno, la pianta sviluppa foglie a rosetta (figura 1.2) direttamente sulla testa della radice, il fittone, di colore bianco e dalla forma conica e allungata e dalla consistenza carnosa, che si ingrossa e accumula saccarosio nei vacuoli delle cellule parenchimatice e che, al termine dello sviluppo vegetativo, viene impiegato per l'estrazione industriale dello zucchero. Per la raccolta del seme, invece, si deve aspettare il termine dello sviluppo riproduttivo quando, dopo un periodo di vernalizzazione, si sviluppa lo scapo florale. Per evitare un grave danno alla qualità tecnologica

delle radici e della resa in zucchero, le varietà commerciali sono selezionate per evitare una prefioritura già al primo anno, soprattutto per quelle a semina autunnale.



**V 1.0**



**V 1.1**



**V 1.8**



**V 2.1**



**V 2.6**



**V 3.8**



**V 4.1**



**V 4.7**



**V 5.7**



**V 6.3**



**V 7.2**



**V 8.4**

**Figura 1.2-** Foto scaricabile dal sito web dell'American Crystal Sugar Company ([www.crystalsugar.com/agronomy/resources/lib/growth/growth.pdf](http://www.crystalsugar.com/agronomy/resources/lib/growth/growth.pdf))

### 1.1.1. Condizioni climatiche e crescita della bietola

Nonostante la bietola sia diffusa in una vasta area geografica e si adatti a condizioni pedo-climatiche differenti, preferisce i climi temperati per le più favorevoli combinazioni di luce, temperatura e precipitazioni, motivo per cui si è diffusa gradualmente in buona parte del bacino del Mediterraneo (tabella 1.1). Temperature comprese tra 15 °C e 20 °C favoriscono l'accumulo dello zucchero nel fittone, un eccessivo innalzamento delle temperature provoca una riduzione nella resa in zucchero mentre temperature di 5-8 °C nelle prime fasi (4-6 foglie vere), protratte per alcuni giorni consecutivi, possono provocare ingenti danni sulla produttività.

Parametri climatici	Valori ottimali
Temperatura media	15-20 °C
Temperatura minima	>10°C
Temperatura massima	<28°C
Umidità	valori medi

**Tab. 1.1-** Valori ottimali dei parametri climatici (fonte: disciplinari di produzione integrata- Regione Emilia-Romagna)

L'Italia, con estati calde e con periodi di siccità prolungati, non presenta un clima ideale per la bieticoltura, più adatta a condizioni di elevate piovosità e di terreni sciolti, tipiche dell'Europa centro-settentrionale. Ne consegue che la resa agronomica e industriale di saccarosio, calcolata su base nazionale, è tra le più basse d'Europa anche in annate climaticamente favorevoli (Biancardi *et al.*, 1999) e che le scarse rese determinano costi di produzione elevati, sia per i coltivatori sia per i trasformatori. Per il rilancio della bieticoltura italiana, è quindi di fondamentale importanza il miglioramento genetico varietale finalizzato alla costituzione di nuovi genotipi selezionati per condizioni pedo-climatiche più simili a quelle italiane, quali l'esposizione al freddo e/o alla siccità in giovani plantule, maggiormente soggette ai danni irreversibili sulla produttività in termini di qualità e quantità in saccarosio. Infatti, l'utilizzo di opportune pratiche agronomiche, quali la semina autunnale e gli anticipi di semina primaverile, permettono un miglioramento della resa, in quanto consentono di sfuggire rispettivamente allo stress idrico negli areali meridionali e quello da basse temperature in quelli nordici, ma espongono giovani plantule alle rigide temperature invernali nel primo caso e a possibili ritorni di freddo nel secondo. La semina autunnale praticata a livello mondiale negli areali meridionali, e molto utilizzata anche in Italia (tabella 1.2), prevede l'utilizzo di opportune varietà selezionate soprattutto per la resistenza alla prefioritura, ovvero il passaggio anticipato (già al primo anno di crescita) dalla fase vegetativa a quella riproduttiva causato dall'esposizione precoce ad un periodo di vernalizzazione (esposizione a 4°C-8°C per 10-14

settimane) che provocherebbe decurtazioni quali-quantitative delle rese. Molte sono le varietà di bietola presenti sul mercato, denominate anche “marche”, in quanto sono popolazioni eterozigoti dall’elevata variabilità morfologica, che pertanto possono presentare differenze da un anno all’altro. Un criterio di distinzione tra le marche è il peso/titolo o l’epoca di semina: primaverile (tipo A) o autunnale (tipo AA). La semina primaverile, tipica dell’Italia settentrionale, spesso è eseguita già a febbraio in modo da consentire uno sviluppo anticipato delle piante e maggiore produttività finale. Venturi (1989) riporta una perdita di 40-60 Kg/ha di saccarosio per ogni giorno di ritardo nella semina procrastinando da metà marzo a metà aprile.

<b>Tipologia varietà</b>	<b>2004/2005</b>	<b>2005/2006</b>	<b>2006/2007</b>	<b>2007/2008</b>
<b>Autunnale</b>	51.000	27.400	19.000	14.700
<b>Primaverile</b>	329.000	101.000	110.000	77.300

**Tab. 1.2-** Vendita di seme di bietola da zucchero in Italia (in Unità) suddiviso per varietà a semina primaverile e autunnale.

(Fonte: dati AIS tabella fornita dall’Associazione Italiana Sementi, rapporto attività 2008)

### **1.1.2 Il genoma**

La barbabietola da zucchero è una specie diploide ( $2n=2x=18$ ) altamente eterozigote con un genoma aploide stimato introno a 714 a 758 Mpb (Biancardi *et al*, 2005), poco più grande di quello del riso (340-560 Mb/genoma aploide) che è considerato la specie con il patrimonio genetico più piccolo fra quelle di interesse commerciale ed economico (Bennet *et al.*, 2000) e molto più grande della specie modello *Arabidopsis thaliana* (157 Mbp). Esistono anche genotipi poliploidi (triploidi  $3n=27$ , tetraploidi  $4n=36$ ) impiegati in programmi di miglioramento genetico finalizzati ad esempio alla piramidizzazione di geni di resistenza o all’aumento del vigore a seguito dell’aumento dell’eterosi. Alcune specie, appartenenti alla Sezione *Corollinae* e *Procumbentes* sono ad esempio tetraploidi (tabella 1.3). Bosemark e Bormontov, nel 1971, per primi, caratterizzarono 7 dei 9 cromosomi del cariotipo di bietola, successivamente fu osservato che oltre alle costrizioni centromeriche, si possono osservare costrizioni secondarie, coinvolte nell’organizzazione del nucleolo e che, nel cromosoma 1, determinano la divisione tra cromosoma principale e satellite (cromosoma-SAT).

Non esiste ancora per bietola un progetto di sequenziamento su larga scala dell’intero genoma e attualmente i dati di sequenza disponibili in banche dati pubbliche sono ancora piuttosto limitati (*nucleotide entries*: 350; *nucleotide ESTs entries*: 2784, in Genebank), di cui la maggior parte derivati da librerie a cDNA di plantule soggette a diversi tipi di stress, per lo più abiotici.

<b>Section Beta</b>	
<i>B. vulgaris</i> L.	"Basic" diploid, triploid, tetraploid
<i>B. macrocarpa</i> Guss.	Diploid
<i>B. patula</i> Ait	Diploid
<b>Section Corollinae</b>	
<i>B. lomatogona</i> Fisch. et May.	"Basic" diploid, autotetraploid
<i>B. macrorhiza</i> Stev.	"Basic" diploid
<i>B. corolliflora</i> Zos. ex Buttler	Autotetraploid
Agamic complex:	
<i>B. intermedia</i> Bunge	Allotetraploid
<i>B. trigyna</i> Waldst. et Kit.	Allotetraploid, allohexaploid
<b>Section Nanae</b>	
<i>B. nana</i> Boiss. et Heldr.	Diploid
<b>Section Procumbentes</b>	
<i>B. procumbens</i> Sm.	Diploid
<i>B. webbiana</i> Moq.	Diploid
<i>B. patellaris</i> Moq.	Autotetraploid

a.

Publicazione	N° ESTs	Sequenze uniche	Tipo di Tessuto	Condizioni di crescita
Schneider <i>et al.</i> (1999)	35	35	Foglia	ottimali
Bellin <i>et al.</i> (2002)	2996	2048	Foglia, radice, infiorescenza,	ottimali
Herwig <i>et al.</i> (2002)	30444	25000	Foglia, radice, infiorescenza	ottimali
Bellin <i>et al.</i> (2007)	11520	-	Radice	ottimali
Pestsova <i>et al.</i> (2008)	2784	2251	Semi	Stress salino, idrico e da freddo

b.

**Tabella 1.3-** Specie del genere *Beta* (a.; Tabella tratta da Biancardi *et al.*, 2005). In tabella 1.3 b, sono riassunti alcuni tra i più significativi studi della porzione espressa del genoma di bietola. Sono riportate il numero delle ESTs ottenute, il numero dei *singleton*, l'organo da cui sono state estratte e le condizioni di crescita delle piante.

La costruzione di una mappa fisica del genoma di bietola, necessaria per il sequenziamento massivo dell'intero genoma (GABI-BEET, Genome Analysis of Sugar Beet; Dohm *et al* 2008), e l'avanzamento delle nuove tecnologie "high-throughput" di analisi del trascrittoma, implementate dalla crescente disponibilità di strumenti bioinformatici capaci di gestire migliaia di dati in maniera automatizzata, oggi rappresentano una valida, e molto più economica alternativa al sequenziamento dell'intero genoma soprattutto in specie non modello. Diversi lavori, riassunti in tabella 1.3 b, condotti su bietola hanno permesso di ottenere una preziosa fonte di sequenze espresse, tra questi, un esempio recente è il lavoro di Pestsova *et al.* (2008) che ha pubblicato 2.784 ESTs (Expressed

Sequence Tags), riuniti in 2.251 *unigene* generati da semi nella fase di germinazione in condizioni ottimali e poi in condizioni di molteplici stress combinati (stress salino, da freddo, da eccesso idrico e osmotico) molto utile per lo studio dei meccanismi di adattamento agli stress in barbabietola da zucchero.

## **1.2 Stress abiotici**

### **1.2.1 La risposta delle piante alle basse temperature**

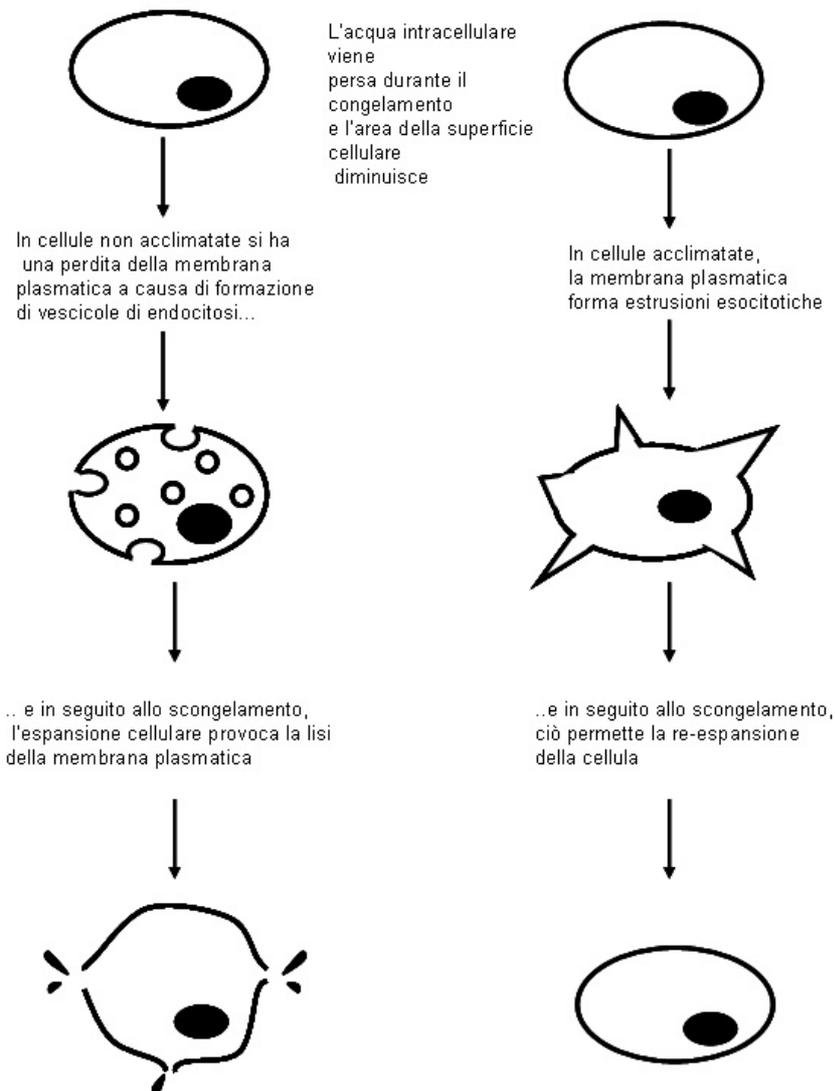
Spesso lo stress da freddo provoca una sintomatologia comune nelle piante: comparsa sui tessuti di imbrunimenti o uno scolorimento delle foglie a seguito dell'ossidazione dei polifenoli e un rallentamento nella crescita. Da un punto di vista fisiologico, i primi metabolismi che ne risultano danneggiati sono la fotosintesi, la traslocazione dei carboidrati, la respirazione cellulare e la sintesi proteica, associato ad un aumento della degradazione proteica. Alla base di questi cambiamenti, un meccanismo comune provoca la perdita delle proprietà della membrana con conseguente rilascio dei soluti. La suscettibilità al freddo è infatti spesso legata ad un'elevata percentuale di lipidi costituiti da acidi grassi saturi che provocano la solidificazione della membrana, sottoposta ad abbassamento termico, in uno stato semicristallino (Taiz & Zaiger, 1996).

Una maggiore tolleranza al freddo è correlata all'acclimatamento (o *hardening*), fenomeno per il quale una preventiva esposizione a basse temperature (di solito 4°C per più giorni) induce un aumento della tolleranza alle temperature di congelamento (Thomashow, 1999); nel 1988, Williams *et al.* spiegarono questo processo con un aumento della percentuale dei lipidi insaturi nella membrana con conseguente aumento della sua fluidità (Figura 1.3).

L'acclimatamento coinvolge numerosi cambiamenti fisiologici e biochimici (Posmyk *et al.*, 2001) che vengono regolati mediante cambiamenti nell'espressione genica (Mastrangelo *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005). È infatti noto da tempo che tale fenomeno è accompagnato da cambiamenti nell'espressione di diversi geni (Guy, 1990).

### Risposta sensibile al congelamento

### Risposta tollerante al congelamento

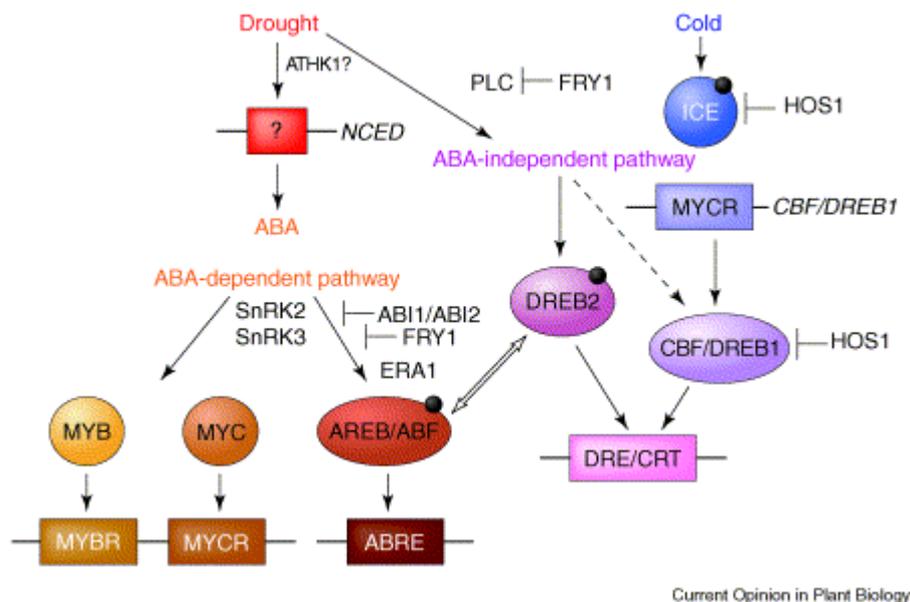


**Figura 1.3-** Danno cellulare in seguito all'esposizione a basse temperature. Sulla sinistra, la rottura cellulare provoca la fuoriuscita di materiale cellulare in piante suscettibili al freddo. Sulla destra, in piante tolleranti alle basse temperature, il materiale cellulare viene invece trattenuto.

Al contrario, temperature da congelamento (sotto zero) determinano la lenta formazione di grandi cristalli di ghiaccio negli spazi intracellulari con conseguente disidratazione per fuoriuscita di acqua dalla cellula e distruzione della sua struttura. La tolleranza al freddo è anche associata ad un rapido accumulo di sostanze crioprotettive, ovvero osmoprotettori, quali ad esempio la glicinbetaina (specialmente presente in barbabietola da zucchero), ma anche la prolina, il saccarosio o le proteine anti-congelamento (AFP1) che contribuiscono a ridurre la perdita di acqua dai tessuti cellulari.

La tolleranza agli stress ambientali è ritenuta da molti autori un carattere complesso, controllato in modo articolato. In molte piante di interesse agrario, sono noti un certo numero di geni “stress responsive”: geni codificanti enzimi per la sintesi di osmoprotettori, geni LEA (Late embryogenesis abundant), geni regolatori, geni coinvolti nello stress ossidativo, geni che codificano *chaperon* molecolari, geni coinvolti nell’insorgenza di *osmotic adjustment*. Tuttavia, risulta chiaro dai risultati finora accumulatisi in diverse specie vegetali che la tolleranza di una pianta a condizioni di stress richiede la regolazione coordinata di molti geni. E’ noto che il calcio, ad esempio, sia un importante messaggero coinvolto nella trasduzione del segnale, mediata anche da calmoduline e protein-chinasi, che porta alla modulazione di tali geni. L’ individuazione dei geni responsabili di tale tratto e la caratterizzazione delle loro funzioni sono requisiti necessari per la selezione di piante capaci di tollerare la situazione di stress e di garantire una produzione stabile.

Molti geni, i cui trascritti si accumulano in risposta alle basse temperature, sono stati isolati in *Arabidopsis*. L’elemento regolativo, CRT-DRE (C-repeat dehydration responsive element; Shinozaki K, 2003), contenente la sequenza CCGAC, presente nella regione promotrice dei geni coinvolti nella risposta alle basse temperature, conferisce, ad esempio, la capacità di risposta alle basse temperature; tramite alcuni attivatori trascrizionali che si legano a questo elemento (CBF1, CBF2, CBF3, DREB1b, DREB1c, DREB1a, DREB2; figura 1.4), i cui geni si trovano sul cromosoma 4 in arrangiamenti a tandem. In effetti, è stato dimostrato che in piante transgeniche di *Arabidopsis* che sovraesprimono queste proteine, si ha l’induzione di molti geni contenenti elementi CRT-DRE anche in assenza di trattamento con basse temperature. E’ stato definito quindi un “regulone CBF”, che include tutti i geni contenenti elementi CRT-DRE e quindi attivati dai fattori CBF/DRE, e che include i geni coinvolti nell’insorgenza della tolleranza da acclimatazione (Medina, 1999). E’ stato inoltre dimostrato che il sistema CBF/DREB1 è ubiquitario nelle piante, essendone stata dimostrata la presenza e il coinvolgimento in colza, segale, grano e pomodoro. Questo *pathway* non è tuttavia l’unico coinvolto nella trasduzione del segnale di carenza idrica, anche se riveste particolare importanza perché i segnali di trasduzione vengono “convogliati” sugli stessi elementi genetici coinvolti nello stress da freddo. Altri pathway che si sono dimostrati essenziali durante la risposta allo stress da freddo sono invece mediati da acido abscissico (ABA), a fanno capo ad elementi ABRE (Abscisic-acid responsive elements; Fowler and Thomashow, 2002).



**Figura 1.4-** Regolazione dell'espressione genica alla siccità e al freddo.

Gli elementi *cis* che sono coinvolti nella risposta sono segnati nei box. Mentre i fattori di trascrizione sono nei cerchi o negli ovali. I piccoli cerchi neri indicano la necessità della fosforilazione come modificazione ai TF in risposta allo stress. La parte superiore della figura indica la cascata del segnale che viene attivata in maniera rapida e veloce subito dopo lo stress (ICE, DREB2, NCED), mentre nella parte sottostante i fattori che rispondono in maniera più lenta e che probabilmente sono coinvolti una fase più lenta e adattativa della risposta allo stress (AREB/ABF, MYB, MYC, CBF-BREB).

Tratta da Shinozaki *et al* (2003)

L'analisi di sequenza ha inoltre messo in evidenza che molti geni COR, identificati come coincidenti con i geni RD (*responsive to dehydration*), evidenziano la natura comune della risposta di *Arabidopsis* ai due stress osmotici, entrambi tradotti in una caduta del  $\Psi_w$  (Moffat, 2006). Una conferma deriva anche dal fatto che piante transgeniche che sovraesprimono i fattori di trascrizione CBF o DREB1, mostrano un'aumentata tolleranza sia al freddo che alla siccità (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

### 1.2.2. La risposta della barbabietola alle basse temperature

Le condizioni pedo-climatiche italiane sono spesso sfavorevoli alla bieticoltura sia a causa delle estati calde e siccitose (soprattutto al Sud) sia per i terreni prevalentemente argillosi con conseguenti difficoltà di drenaggio, sia per l'elevata incidenza di fitopatie, trascurabili invece in altre zone d'Europa, quali la rizomania e soprattutto la cercosporiosi. L'utilizzo di opportune pratiche agronomiche (semina autunnale) e la necessità di selezionare ibridi adatti alle condizioni pedo-climatiche italiane è spiegabile prendendo in considerazione le ingenti decurtazioni della resa

provocate da stress abiotici, quali la temperatura, luce, apporto idrico disponibilità di nutrienti. Inoltre la resistenza al freddo risulta particolarmente utile anche per migliorare la sopravvivenza dei piantoni sul vivaio invernale. D'altra parte, la tendenza a seminare precocemente (semina primaverile precoce) allo scopo di avere rese saccarifere più alte crea il pericolo di ritorni di freddo particolarmente rischiosi per plantule ancora giovani (fino allo stadio V3.8; figura 1.1). Infatti, la tolleranza al freddo in bietola aumenta man mano che la pianta procede nello sviluppo vegetativo, mentre nella fase di germinazione, le basse temperature risultano particolarmente pericolose. Allo stesso modo, durante la fase di emergenza in plantule seminate ad autunno, il pericolo principale è rappresentato dall'eventuale brusco calo delle temperature invernali. Una temperatura di  $-2^{\circ}\text{C}$  in questi casi può provocare una mortalità del 100% delle plantule se queste si trovano allo stadio cotiledonare, mentre solo temperature di  $-10^{\circ}\text{C}$  arrivano a provocare lo stesso effetto su piante adulte allo stadio di 2-4 foglie vere (Biancardi *et al.*, 2005). Sulla percentuale di mortalità, oltre alle temperature, influiscono molti altri fattori: umidità del terreno, tempi di esposizione, rapidità del congelamento e del disgelo, sanità della coltura, ecc.

Genotipi diversi reagiscono diversamente all'esposizione a basse temperature, dimostrando l'esistenza di una variabilità genetica sufficiente per studiare i meccanismi genetici di base e in un secondo tempo operare una selezione, similmente a quanto effettuato su altre specie (Foolad and Lin, 2000).

In questo settore, le prime esperienze hanno riguardato la capacità di alcuni genotipi di germinare e sopportare nelle prime fasi dell'accrescimento temperature fra  $+1$  e  $+3^{\circ}\text{C}$  (Wood, 1952), e l'ereditabilità di tale tratto.

Se diversi studi sono stati fatti sulla specie modello e su altre specie di interesse industriale quale mais e orzo, in barbabietola da zucchero non sono stati ancora ottenuti dati molecolari che confermino i modelli di trasduzione del segnale identificati in *Arabidopsis* o che mettano in evidenza specifici *pathways* di espressione genica per questa specie. Inoltre, non sono ancora stati condotti studi di identificazione di geni differenzialmente espressi in risposta al freddo. Tale caratterizzazione complessa a livello genetico richiede strumenti di analisi e di studio integrati, in cui discipline diverse possano fornire una visione globale del fenomeno.

### **1.2.3. La misura del danno da basse temperature**

Oltre all'osservazione fenotipica, sono stati sviluppati diversi metodi per valutare il danno da freddo al fine di individuare il livello di resistenza delle piante alle basse temperature.

La maggior parte dei test viene condotta su piante allevate in condizioni controllate, esponendo piante intere o porzioni di esse a temperature decrescenti. L'esposizione su piante intere ha il vantaggio permettere la valutazione anche del *recovery*. Warren *et al.* (1996) e il protocollo

disponibile su “plant stress/methods” (<http://www.plantstress.com/methods/index.asp>) consigliano l’uso di singoli organi interi (foglie, per esempio); mentre Kaplan *et al.*(2004) utilizzano l’intera plantula di *Arabidopsis*.

La scelta del metodo dipende dall’obbiettivo dello studio, dal tipo e dallo stato fisiologico del materiale analizzato. In ogni caso, un meccanismo generale che induce la morte cellulare in risposta al freddo, indipendentemente dalla specie, tessuto e severità del trattamento utilizzato, è il danno alle membrane. Una stima quantitativa si può, pertanto, avere dalla misura dell’aumento della permeabilità della membrana con conseguente aumento del rilascio di ioni che può essere rilevato dal flusso di elettroliti.

Il metodo fu originariamente sviluppato da Sullivan (1960, University of Nebraska), il quale misurò l’CMS (Cell Membrane Stability) su sorgo e mais sottoposti a shock da calore, immergendo il tessuto danneggiato in una soluzione acquosa e misurando il rilascio cellulare degli elettroliti. Successive variazioni sono state sviluppate al fine di misurare anche la risposta al freddo e alla disidratazione.

Il test del rilascio degli elettroliti (EL test) è basato sul principio che il danno alle membrane cellulare provochi un aumento del rilascio degli elettroliti, soprattutto K<sup>+</sup> dalla cellula. E misura la conduttività elettrica della soluzione acquosa nella quale vengono immersi i campioni dopo il ciclo di trattamento termico. Fu Stuart (1939) che introdusse l’idea di esprimere la quantità di elettroliti rilasciati come percentuale degli elettroliti totali contenuti nel campione, ottenuti dopo la sua totale distruzione. La durata dell’incubazione è di solito tra le 20 e 24 ore, durante le quali il campione viene tenuto in agitazione e dopo le quali il contenuto di elettroliti viene letto con un conduttimetro, in diverse misure indipendenti. La distruzione del tessuto può avvenire invece tramite bollitura, autoclave o congelamento.

Sukumaran and Weiser (1972), Brandt (2000), Nunes and Smith (2003) suggeriscono di calcolare il rilascio degli elettroliti (L value, leaching ratio, or Relative electrolyte leakage) in questo modo:

$$REL_T\%=(EL_T/EI_{AUTOCCL}) X100$$

Mentre è del 1981 ad opera di Blum and Ebercon, le seguenti formule per valutare il danno tissutale ( Index of Injury ):

$$1) I.I.\%=(1-REL_T)/(1-REL_C)*100$$

$$2) CMS \% = \frac{1 - (Ti / Tm)}{1 - (Ci / Cm)} X 100$$

$$3) Injury index = 100 - CMS \%$$

Altri autori (Van de Dijk *et al.*, 1985, Rizza *et al.*, 1994, Ortiz *et al.*, 2001), esprimono il danno cellulare con altra formula che tiene conto anche della conducibilità dell'acqua usata nell'esperimento, misurata a 25 °C. La formula è la seguente:

$$4) \% \text{ of membrane damage} = (C_x - C_c)/(C_m - C_c) \times 100$$

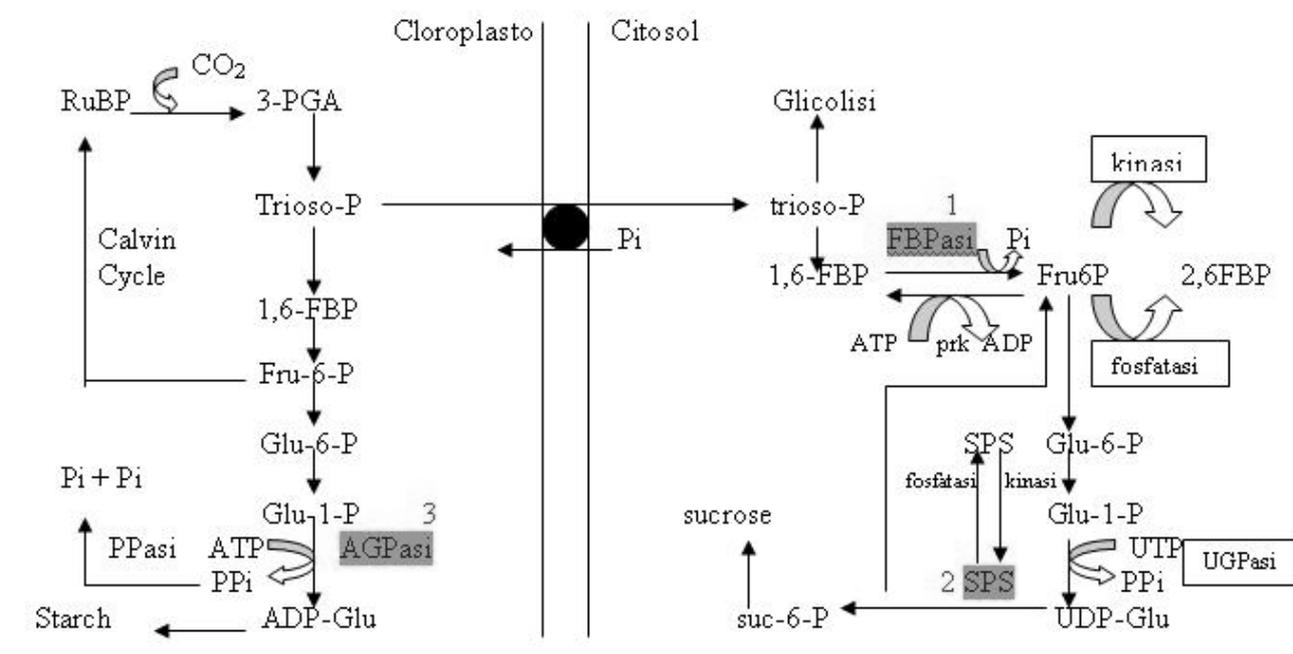
Dove  $C_c$  è la conducibilità dell'acqua a 25 °C,  $C_x$  è la conducibilità dell'acqua dove sono stati immersi i campioni stressati e  $C_m$  è la conducibilità massima dell'acqua dei campioni dopo essere stati autoclavati.

Altre tecniche, utilizzate soprattutto sulle specie legnose, si basano sulla fluorescenza cellulare, sul rilascio di gas (cianidina), cambiamenti sul potenziale di pressione dello xilema (Calkins e Swanson, 1990)

### 1.3 Qualità e resa in saccarosio

Come è noto, la barbabietola da zucchero accumula saccarosio come composto di riserva nel fittone, a differenza della maggior parte delle specie che accumulano invece composti polimerici come l'amido, accumulato dalla barbabietola solo in piccola parte, o proteine di riserva. Disaccaride composto da due esosi D-glucosio e D-fruttosio, il saccarosio è uno zucchero semplice, molto solubile e reattivo, rispetto a quelli più complessi quali l'amido, la cellulosa o la lignina. Nella barbabietola da zucchero, il saccarosio è sintetizzato nel citosol a partire dal trioso fosfato, formato durante il Ciclo di Calvin (ciclo C3) nel cloroplasto e, successivamente, traslocato nel citosol tramite il sistema di antiporto con lo ione fosfato presente nella membrana interna del cloroplasto. Qui, il fruttosio 6-fosfato, sintetizzato grazie all'attività dagli enzimi fruttosio bi-fosfato aldolasi (FBPald) e fruttosio 1,6 bifosfatasi (FBPase), è incorporato all'UDPG (uridina difosfoglucosio), a sua volta sintetizzato a partire dal trioso fosfato, grazie all'attività della saccarosio fosfato sintasi (SPS). La FBPase rappresenta probabilmente l'enzima chiave nella regolazione del metabolismo del saccarosio ed è a sua volta inibita dal fruttosio 2,6 bifosfato, la cui formazione è inibita dal trioso fosfato permettendone una regolazione a feedback (figura 1.5). Esperimenti effettuati tramite tracciante radioattivo dimostrano che negli organi fotosintetici il saccarosio viene sintetizzato e immagazzinato nel vacuolo delle cellule parenchimatiche (Willenbrink *et al.*, 1984) oppure traslocato tramite il floema alle radici o alle giovani foglie dove la traslocazione trasversale avviene per via apoplastica. Un'ipotesi è che la successiva degradazione nelle radici ad opera della saccarosio sintasi o dell'invertasi in glucosio e fruttosio sia fondamentale per mantenere il gradiente

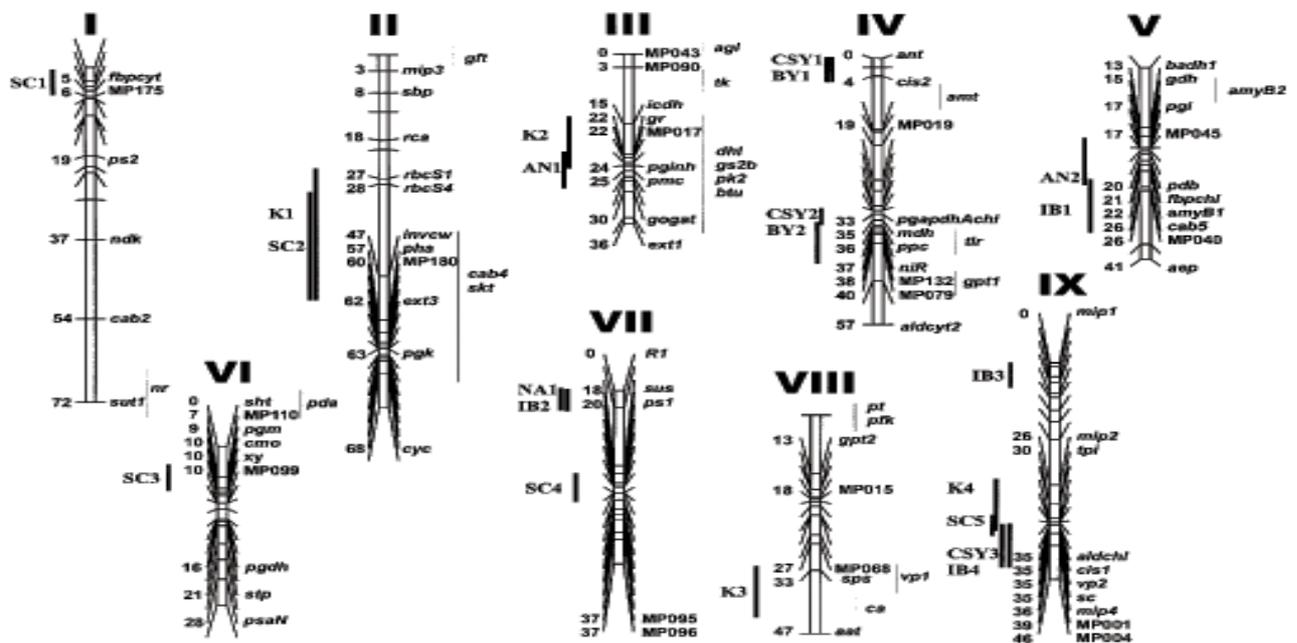
source-sink e che la ri-sintesi avvenga dopo la loro traslocazione nel citosol delle cellule parenchimatiche e l'accumulo nei vacuoli (Fiew and Willenbrink, 1990). Uno studio condotto da Paulinova *et al.* (2002) suggerisce che le saccarosio sintasi in barbabietola da zucchero abbiano un'azione degradativa nelle radici e biosintetica nelle foglie.



**Figura 1.5-** Metabolismo del saccarosio e dell'amido. (immagine scaricabile da [www.tursiops-biology.com/fisiologia\\_vegetale.htm](http://www.tursiops-biology.com/fisiologia_vegetale.htm) e ivi riadattata)

La produttività, intesa in senso commerciale, della barbabietola da zucchero è un carattere complesso di primaria importanza per i *breeders* nei programmi di miglioramento genetico, e dipende dal contenuto in saccarosio (SC), dalla resa in saccarosio (SY) e dal contenuto in azoto, potassio e sodio (N, K, Na), fattori determinanti durante il processo di estrazione e che condizionano negativamente la resa in zucchero estraibile (fattori “melassigeni”). Il carattere CSY comprende il contenuto e la resa in saccarosio (SC e SY). Essendo un carattere quantitativo è controllato da QTL (Quantitative Traits Loci), regioni cromosomiche in grado di influenzare la sua espressione fenotipica, che risulterà essere a sua volta controllata anche dalle condizioni ambientali.

Un'analisi QTL per il carattere CSY è stata effettuata da Weber *et al.* (1999; 2000) e da Schneider *et al.* (2002). Quest'ultimo ha ottenuto una mappa genetica (figura 1.6) di barbabietola da zucchero costruita utilizzando 18 marcatori RFLP e 99 marcatori AFLP. 21 QTLs sono stati ottenuti, tra i quali sono stati identificati: la colina mono-ossigenasi (*cmo*) la saccarosio fosfato sintasi (*sps*), la fruttosio bifosfato aldolasi (*aldchl*), la fruttosio bifosfatasi (*fbp*) e la subunità minore della rubisco (*rbcs1*).



**Figura 1.6-** Mappa di associazione e rispettivi QTLs per il carattere CSY (tratta da Schneider *et al.*, 2002)

## 1.4 Le nuove tecnologie nell'analisi del trascrittoma

### 1.4.1 Le scienze –omiche e le nuove frontiere della bioinformatica: l'integrazione tra analisi *in silico* e analisi *in lab*

L'avanzamento delle cosiddette tecnologie *high-throughput* nel settore della genomica, ovvero dello studio su "larga scala" della struttura, funzione ed evoluzione di interi genomi, ha rivoluzionato la biologia molecolare fino a quel momento intesa come studio dei singoli geni.

Dalla genomica si è passati quindi alla post-genomica creando quelle che oggi genericamente vengono indicate come scienze –omiche, sempre più specifiche e complesse, quali la genomica funzionale, la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica e l'interattomica, importanti per comprendere le basi molecolari del comportamento morfo-fisiologico di un intero organismo.

L'enorme mole di dati prodotti dalle scienze –omiche, (basti pensare ai progetti di sequenziamento di interi genomi) ha reso necessario il contemporaneo sviluppo di *tools* bioinformatici in grado di poterli gestire ed interpretare. La necessità di integrare dati ottenuti da approcci sperimentali diversi per ottenere modelli, anche tramite sistemi computazionali, in grado di spiegare la struttura del sistema biologico, come ad esempio le reti di regolazione genica e

biochimica, va sotto il nome di *system biology*. Lo sviluppo di software sempre più potenti e sempre più mirati a problematiche specifiche consente oggi non solo la costruzione di database dove vengono considerati molti dei parametri e delle caratteristiche delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche, ma anche di effettuare “predizioni” virtuali della loro funzione biologica basate sull’analisi di sequenza, di costruire modelli strutturali di profili proteici di *foldings* sulla base dell’analisi della sequenza amminoacidica, ma anche di effettuare predizioni basate sull’analisi trascrittomiche, estraendo i relativi dati di espressioni genica (per esempio, il “microarray data mining”).

Sebbene i progetti di sequenziamento genomico siano di fondamentale importanza grazie all’ampliamento della conoscenza della struttura dei genomi, è anche vero che la maggior parte dei progetti riguardano specie modello o specie di importante interesse economico. In questo caso alcune specifiche branche della bioinformatica forniscono un valido aiuto per quelle specie per cui le informazioni molecolari sono ancora ridotte per la mancanza di progetti di sequenziamento genomico.

#### **1.4.1.1. ESTs (EXPRESSED SEQUENCE TAGS): applicazioni e limiti**

L’analisi del trascrittoma, in particolare, ha lo scopo di caratterizzare i trascritti, sequenziando direttamente i cDNA, o parti di esso (ESTs) e valutare il livello di espressione genica in tessuti e/o in condizioni fisiologiche diverse. Presupposto fondamentale per capire la funzione di un gene, non completamente identificabile con assoluta certezza tramite analisi *in silico*, è infatti capirne il profilo trascrizionale. L’analisi quali-quantitativa della presenza di un trascritto in opportune condizioni/tessuti consente di interpretare e “annotare” il significato dell’ “informazione” in esso contenuta. Il trascrittoma è un insieme dinamico di trascritti, poiché il genoma di ogni singola cellula esprime solo un numero limitato e in continuo cambiamento di geni rispetto a quelli presenti, motivo anche per cui la complessità di un organismo non può essere spiegata unicamente dalla dimensione del suo genoma.

Conoscere la struttura e la funzione della porzione espressa del genoma è di grande importanza per la genomica strutturale, per il *mapping* e per lo studio dell’evoluzione dei genomi e della genomica funzionale.

In questi casi, la presenza di banche dati ESTs, ovvero di parziali sequenze del cDNA (solitamente relative alla zona del 3’) e la disponibilità di software per la loro analisi sopperisce alla mancanza di progetti di sequenziamento genomico e sempre più spesso progetti ESTs precedono quelli genomici. I principali svantaggi di questa tecnica sono la ridondanza in banca dati di trascritti sovraespressi, la sottorappresentazione di trascritti rari e la difficoltà nell’attribuire una buona corrispondenza tra EST e geni a causa della presenza di *splicing* alternativi. Per arricchire di

trascritti poco espressi il pool di ESTs, si può ricorrere all'utilizzo di librerie normalizzate, che, d'altra parte determinano la perdita dell'indicazione del livello di espressione genica derivante dal calcolo della frequenza di ESTs presenti nella condizione o tessuto di interesse. L'identificazione di ESTs ha senza dubbio il grande vantaggio di consentire l'identificazione di nuovi geni, di associare l'espressione di particolari geni a condizioni diverse, tramite il calcolo della frequenza della presenza di EST in particolari condizioni, e di determinare la sequenza completa di trascritti di interesse. A volte le ESTs vengono anche utilizzate in genomica strutturale per la costruzione di mappe geniche come *anchors* sullo scheletro cromosomico.

Le ESTs si ottengono per sequenziamento parziale e *random* (tramite l'utilizzo di primer universali), partendo o dall'estremità 5' o da quella 3', di cloni di cDNA ottenuti in seguito alla costruzione di librerie di cDNA relative a popolazioni di mRNA specifiche per la condizione di interesse (tessuto, organo, stadio di sviluppo o condizione ambientale). Tale approccio consente una stima del livello di espressione di ogni singolo gene identificato, tramite la valutazione della "rappresentatività" di ogni singola EST nella libreria, al contrario usando una libreria sottrattiva si perde questa informazione ma si ha il vantaggio di individuare con più facilità anche i trascritti poco espressi. Oggi, più genericamente, vengono denominate EST anche le sequenze parziali ottenute in seguito a analisi di trascritti differenzialmente espressi ottenute tramite cDNA-AFLP, ad esempio.

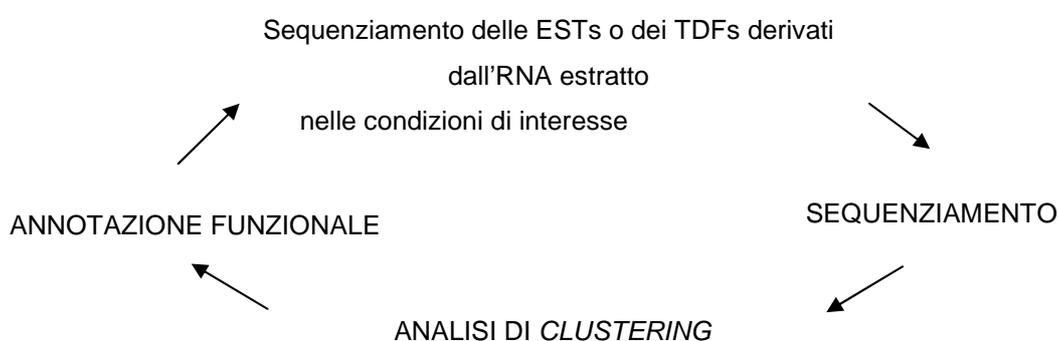
L'analisi delle EST ha alcuni limiti, che in parte vengono superati tramite opportuna analisi bioinformatica:

- presenza in sequenze ESTs di tratti di sequenze del vettore di clonaggio,
- presenza di sequenze ripetute,
- cDNA fusi nello stesso vettore (cDNA chimerici),
- varianti di splicing,
- polimorfismi,
- scarsa qualità delle sequenze

L'insieme delle sequenze ESTs, e delle relative caratteristiche distintive, è registrato e catalogato in banche dati specifiche, in modo che sia possibile la loro consultazione e aggiornamento in maniera rapida e facile. Le tre banche dati di sequenze nucleotidiche principali, dette primarie poiché contengono il dato grezzo non elaborato da tools computazionali, condividono la maggior parte delle informazioni mentre differiscono soprattutto per il formato con cui i dati vengono rilasciati:

- GeneBank (America; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>);
- EMBL (Inghilterra; EBI; <http://www.ebi.ac.uk/embl/>)
- DDBJ (Giappone; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/welcome-e.html>)

Tra le banche dati primarie specifiche per ESTs, la più usata è dbEST (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>), il cui svantaggio principale è la ridondanza di sequenze in esso contenute. L'analisi ESTs consente di attribuire un importante valore aggiunto al dato di sequenza tal quale contenuto nelle banche dati primarie, consentendo di pulire le ESTs da sequenze "contaminanti" e di riunire tutte le sequenze appartenenti allo stesso trascritto tramite un'analisi di *clustering* ovvero raggruppamento di sequenze a seguito del confronto sulla base della loro similarità, creazione di *contig*, per sovrapposizione delle regioni comuni, e unione per l'ottenimento di sequenze consenso (Figura 1.7). Le principali piattaforme bioinformatiche che consentono di effettuare tale analisi sono il TIGR (<http://www.compbio.dfci.harvard.edu/index.html>) e l'*unigene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Figura 1.7-** Ottenimento e analisi di ESTs

#### 1.4.1.2 TIGR: Gene Index database e Assembly Process

(<http://www.compbio.dfci.harvard.edu/index.html>)

L'Istituto per la Ricerca in Genomica (TIGR, Rockville, USA) è un'organizzazione no-profit fondata dal US National Institute of Health (NIH) la cui attività è finalizzata ad integrare i dati molecolari provenienti da programmi pubblici internazionali di sequenziamento del genoma e del trascrittoma con l'obiettivo di rappresentare una visione non-ridondante di tutti i geni.

Il TIGR Gene Index (TGI) oggi è presente, liberamente consultabile sul sito del "Computational Biology and Functional Genomics Laboratory", e rappresenta uno dei più rappresentativi sforzi di analisi di ESTs il cui fine va dalla ricerca di profili di espressione genica, all'identificazione di geni di interesse, all'individuazione del ruolo biochimico/cellulare e alla comparazione inter-specifica finalizzata ad analisi filogenetiche. Ad oggi, 114 sono i database specie-specifici relativi a 42 specie animali, 47 vegetali, 15 protisti e 10 funghi.

L'avanzamento tecnologico e le nuove, e più veloci, metodiche *whole-genom*, ad esempio il *whole-shot-gun*, utilizzato per il sequenziamento del genoma umano (Celera Genomics), hanno

permesso una veloce espansione della lista dei genomi interamente sequenziati (per esempio, *Drosophila melanogaster*, topo, *Arabidopsis thaliana* e riso). Molte difficoltà sono però legate all'annotazione dei genomi, ovvero all'identificazione del numero dei geni e della loro funzione. Nonostante lo sforzo di predizione genica operata da molti software, attualmente l'analisi delle ESTs rimane lo strumento più diretto per l'identificazione di nuovi geni e per lo studio della porzione espressa del genoma, soprattutto per quelle specie di minor interesse economico per le quali non esistono attualmente investimenti per progetti su larga scala. Basti pensare che milioni di sequenze ESTs sono oggi depositate solo per il regno vegetale (dbEST, GenBank; Childs K. L. *et al*; 2006). Le ESTs sono sequenze "etichetta" ovvero sequenze parziali di trascritti ottenute da sequenziamento dell'estremità 3' o 5' di cDNA scelte dalle librerie in modo casuale. E' evidente quindi l'esigenza di operare un'accurata analisi di queste ampie collezioni di ESTs che potenzialmente potrebbero essere fonte di innumerevoli informazioni. Il primo progetto con questo scopo è l'NCBI UniGene Project che contiene informazioni su circa 29 specie vegetali ma che non fornisce sequenze consenso come output di analisi ESTs (Childs K. L. *et al*; 2006. TIGR Gene Index (TGI), a differenza di UniGene, fornisce un database di trascritti virtuali ad alta fedeltà, chiamati Tentative Consensus (TC), ottenuti da un'accurata, stringente e supervisionata analisi di ESTs e di ET (Expressed Transcripts) estratti da EGAD (The Expressed Gene Anatomy Database). EGAD è un database non rindondante di trascritti umani (HT) e non umani (ET) estratti da GenBank (NCBI). L'utilizzo di algoritmi stringenti, come alternativa a quelli definiti lassi, ha lo scopo di produrre *cluster* piccoli di sequenze con elevata similarità che hanno ad esempio il vantaggio di non contenere varianti di splicing alternativo. L'utilizzo di algoritmi supervisionati rende inoltre maggiormente specifico ed attendibile il risultato includendo dei *seeds*, ovvero trascritti interamente sequenziati (ET), all'analisi di *clustering*.

Il "Gene Index Assembly Process" prevede una fase preliminare definita *pre-processing* che consiste in una pulizia (*cleaning*), finalizzata ad individuare e ad eliminare le sequenze contaminanti (code poli-A o sequenze del vettore), seguita dal mascheramento delle ripetizioni di sequenza che possono indurre delle aberrazioni nella fase di *clustering* o di allineamento, ed infine l'eliminazione della ridondanza, molto comune nelle librerie ESTs, che porta ad una riduzione delle sequenze da sottoporre alle successive fasi di analisi. Il vero e proprio processamento delle sequenze consiste nel valutarne la similarità con l'obiettivo di definire raggruppamenti di sequenze ESTs molto simili che presumibilmente appartengano allo stesso trascritto e la cui sovrapposizione consenta di costruire sequenze consenso il più estese possibile.

In particolare le fasi che si susseguono sono:

1. Allineamento a coppia: mediante mgBLAST, simile al MegaBLAST.

2. *Clustering* ed assemblaggio: TIGR utilizza il “Paracel Transcript Assembler” (PTA), una versione modificata di CAP3 che allinea sequenze ESTs appartenenti allo stesso *cluster* e che si sovrappongono per regioni di almeno 40pb con una similarità di almeno il 94%. Al contrario, qualora lo scopo sia il sequenziamento genomico e quindi l’ottenimento di sequenze il più estese possibile, si usano programmi di allineamento molto diversi come PHRAP.

3. Annotazione funzionale: avviene mediante BLAST X che confronta le sequenze nucleotidiche con quelle proteiche fornendo un dato di similarità ( $\geq 90\%$  omologo e  $< 90\%$  simile) e uno di copertura della sequenza proteica ( $> 98\%$  completa e  $\leq 98\%$  parziale). Poiché il processo di assemblaggio generalmente produce consensi più lunghi delle singole ESTs di partenza, è molto probabile che il consenso contenga sequenze codificanti proteine e quindi che l’assegnazione di una putativa funzione genica sia maggiormente attendibile.

L’output di questa analisi è il Tentative Consensus. Per ogni TC è disponibile un TC report che indica: un riassunto del numero di ESTs estratte dalle varie librerie e, quando disponibili, delle ET, la localizzazione cromosomica, il processo di assemblaggio ed annotazione, le Open Reading Frame (ORF; tramite alcuni programmi come l’NCBI ORF Finder, ESTScan e Frame Finder), oltre che la sequenza in formato FASTA. Putativi SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sono inoltre riportati qualora durante la fase di assemblaggio una variante sia trovata durante il sequenziamento multiplo da librerie indipendenti. Al TGI sono inoltre associati alcuni *tools* particolarmente utili: ad esempio ad ogni report è associato un *link* che, attraverso l’identificativo GO ed EC (Enzyme Commission), riporta ad una rappresentazione grafica della via metabolica con l’esatta collocazione dell’attività dell’enzima codificato dal TC di interesse.

Ogni report contiene inoltre un *link* ad EGO (Eucaryotic Gene Orthologs) database per l’eventuale identificazione di geni ortologhi, ovvero di geni evolutisi in differenti specie a partire da un gene ancestrale comune e che normalmente mantengono la stessa funzione durante la così detta speciazione, a differenza dei paraloghi che invece, originatisi per duplicazione, comunemente evolvono in nuove funzioni. EGO fornisce i Tentative Ortolog Groups (TOGs) particolarmente utili per stabilire le relazioni filogenetiche tra specie diverse (Quackenbush J. *et al*; 2001). Uno dei maggiori vantaggi di TIGR è la facilità con cui si può consultare. La ricerca si può effettuare per *query*, ad esempio tramite una parola chiave (*Keyword*), ad esempio il nome del gene, un numero identificativo della sequenza (TC, ET, EST, GB), il nome del tessuto o della libreria a cDNA, il codice assegnato dal vocabolario di Gene Ontology (GO) o il *pathway* metabolico di interesse. Inoltre, effettuando un WU-BLAST contro il TGI database della specie di interesse, è possibile individuare TC con elevata similarità ad una sequenza nucleotidica o proteica usata come *query*.

Le potenzialità dell’uso di TGI sono molteplici e rappresentano un evidente esempio di come un approccio bioinformatico sia utile ad integrazione del dato sperimentale. Ad esempio,

un'importante applicazione è l'integrazione dei dati relativi ai trascritti virtuali con i progetti di sequenziamento genomico. Infatti, dall'analisi dei TC è possibile ottenere i trascritti predetti (PT) fornendo una prima approssimazione dei geni codificanti in un certo organismo (Quackenbush J. *et al.*; 2001).

## **1.4.2 Real Time PCR**

### **1.4.2.1 Basi teoriche e tecniche**

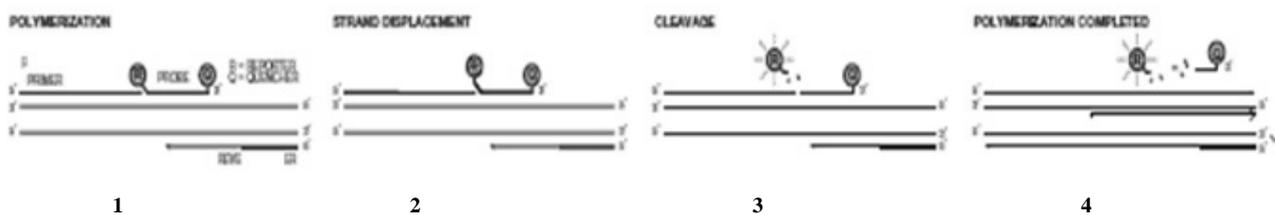
L'avvento della real-time PCR ha radicalmente cambiato il modo di misurare l'espressione genica. La real-time PCR è uno strumento dotato di un termociclatore e di una sezione ottica composta da un laser che emette un fascio di luce ad una determinata lunghezza d'onda (frequenza di eccitazione) eccitando il colorante fluorescente (fluorescent dye) nei campioni ogni 25 millisecondi. La fluorescenza viene poi emessa tra 500 e 660 nm da ciascun pozzetto ed è focalizzata su uno spettrografo che separa la luce secondo la lunghezza d'onda e lo trasferisce ad una CCD camera. L'applicazione "sequence detection" raccoglie il segnale fluorescente dalla CCD camera e analizza i dati. In questo modo viene monitorato l'andamento della reazione di amplificazione mediante un accumulo progressivo di intensità di fluorescenza. Maggiore è la quantità della sequenza target nel campione di partenza, tanto più precocemente, ovvero ad un ciclo di amplificazione minore, il segnale di fluorescenza sarà recepito dal detector.

Attualmente rappresenta la tecnica di analisi quantitativa più accurata, sensibile (1000 volte di più del dot-blot; Wong *et al.* 2005) e precisa per misurare la presenza di una specifica sequenza in un campione di interesse. A differenza della tradizionale PCR "end-point", consente infatti un'analisi quantitativa molto più attendibile e riproducibile in quanto avviene nella fase esponenziale della reazione e non in quella successiva di plateau, fortemente condizionata dall'esaurimento dei reagenti.

Inoltre consente di evitare i passaggi post-PCR (preparazione del gel, corsa elettroforetica, colorazione e visualizzazione delle bande), permette di effettuare la retro trascrizione e la corsa elettroforetica in una fase unica ("One-step real-time PCR"), di individuare di trascritti poco abbondanti e la rilevazione anche di piccole differenze nella quantità di mRNA (Lockey *et al.*, 1998).

Due sono gli intercalanti del DNA prevalentemente usati per individuare il prodotto di PCR: sonde di idrolisi (chimica TaqMan) e la chimica del SYBR Green. La principale differenza tra le due chimiche è la specificità di legame con la doppia elica del DNA. Nel primo, oltre ai due primer relativi alla sequenza target, la specificità è migliorata dall'utilizzo di sonde specifiche, legate a molecole fluorescenti ("reporter" e "quencher"), complementari alla sequenza interposta tra le zone di annealing dei primers che si appaia specificatamente alla sequenze di interesse.

Il metodo sfrutta l'attività 5' nucleasica della Taq DNA polimerasi (Figura 1.8). L'enzima taglia una sonda specifica doppiamente marcata durante la fase di estensione della PCR. La sonda è marcata all'estremità 5' con un reporter dye (FAM, 6-carboxy-fluorescein) e all'estremità 3' con un quencher dye (TAMRA, 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Quando la sonda è intatta non avviene emissione di fluorescenza, quando, durante la fase di estensione la Taq DNA Polimerasi la idrolizza si ha la liberazione dei due fluorocromi che causa un aumento di fluorescenza del reporter dye, prima "mascherata" dalla fluorescenza del quencher dye. Tale fenomeno è denominato FRET (Fluorescence resonance Energy transfer) e consiste nel trasferimento di energia da un fluorocromo ad alta energia ad uno ad energia inferiore presente in prossimità del primo.



**Figura 1.8-** Schema riassuntivo del funzionamento delle sonde TaqMan. Il reporter e il quencher si attaccano rispettivamente all'estremità 5' e 3' della sonda TaqMan (1), durante la fase di estensione (2, 3), invece la Taq Polimerasi taglia la sonda, liberando dalla sonda il reporter che potrà quindi emettere la propria fluorescenza (4). (Real Time PCR Systems, Chemistry Guide; AB 2004)

Al contrario, il SYBR Green si lega al solco minore della doppia elica del DNA evitando l'utilizzo delle sonde, con il conseguente risparmio economico legato alla costruzione di un saggio specifico, ma con una probabilità più alta di generare falsi positivi.

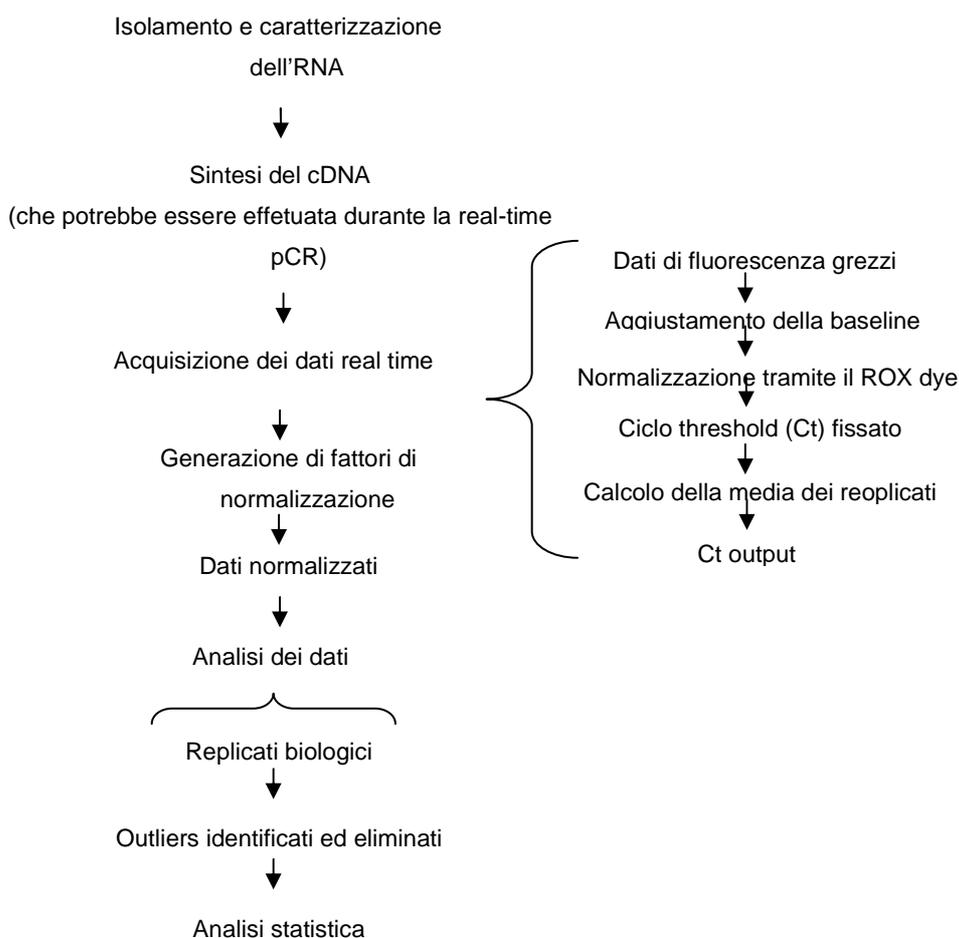
Un accurato uso di controlli e una efficace normalizzazione sono essenziali in ogni analisi quantitativa per ottenere conclusioni robuste (Wong and Medrano, 2005, Quackenbus J., 2002).

Il passive reference, o controllo esogeno, (spesso il ROX) ha lo scopo di normalizzare le variazioni dovute ad esempio alla quantità di master mix aggiunta ad ogni singolo campione o fluttuazioni del di segnale di fluorescenza indipendenti dalla reazione di PCR. Altrettanto importante è l'uso di controlli endogeni, *active reference*, condizione necessaria per correggere le differenze nel contenuto di RNA totale tra campione e campione, ad esempio dovute a diverse efficienze nell'estrazione dell'RNA totale, oppure a differenze nell'efficienza di retro trascrizione o per la presenza di putativi inibitori dell'amplificazione (Wong and Medrano, 2005, Radonic *et al.*, 2004).

Tramite il software associato allo strumento (SDS, per l'Applied Biosystems), all'intensità di fluorescenza rilevata dal detector viene associato un ciclo soglia (misurato in cicli di PCR) ovvero un Ct (threshold cycle) che rappresenta il ciclo di amplificazione in corrispondenza del quale la

curva di crescita esponenziale di fluorescenza interseca il limite fissato dalla linea di *threshold* ovvero in corrispondenza del quale l'emissione della fluorescenza del reporter raggiunge un livello soglia che viene determinato dall'analisi dei dati ottenuti durante i primi cicli del processo di amplificazione.

Uno schema riassuntivo delle fasi con cui viene normalmente impostato un esperimento di real-time PCR si ha nella figura 1.9.



**Figura 1.9-** Esempio di fasi di un esperimento di misura di espressione genica con la real-time PCR (adattata dalla figura di Wong e Medrano, 2005)

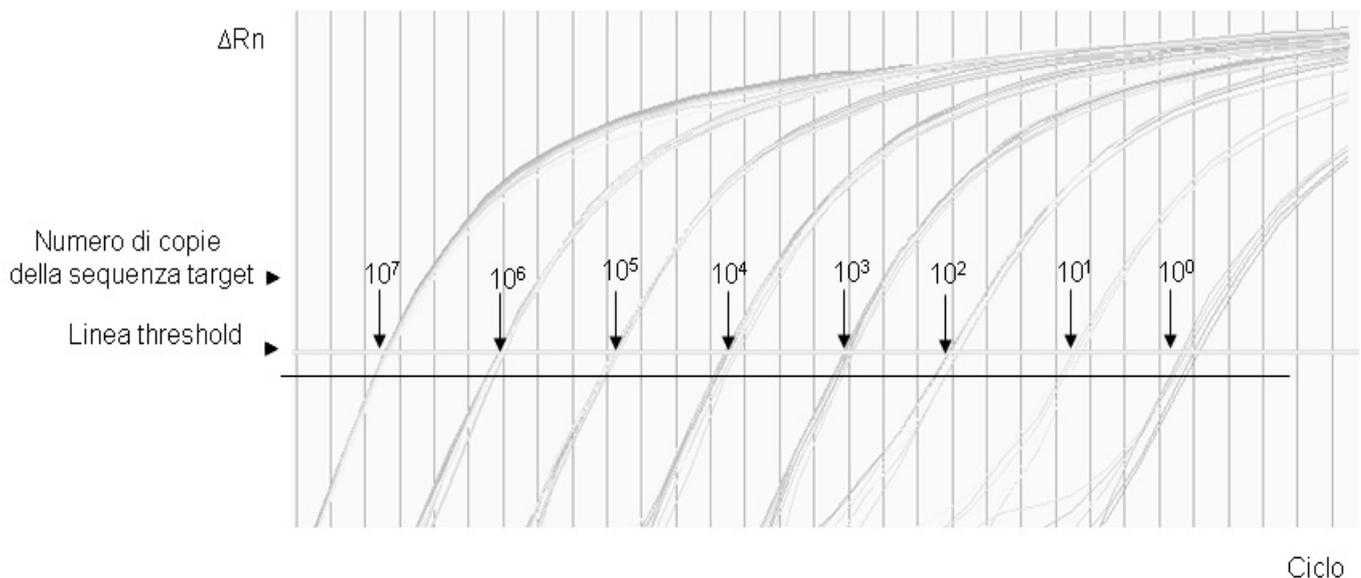
A seconda della problematica sperimentale, la real-time PCR può essere impiegata per una quantificazione assoluta o relativa. La prima tipologia di analisi necessita dell'ottenimento di curve di calibrazione (logaritmo della concentrazione versus ciclo soglia) costruite sulla base di standard di DNA di riferimento a concentrazione nota, non sempre di facile reperimento, e l'amplificazione di un gene endogeno sempre presente nel DNA della specie in analisi (ad esempio, la zeina del mais). Un esempio applicativo molto comune è la valutazione della quantità "assoluta" del DNA di un OGM presente in un campione di partenza. Il limite di tale sistema è piuttosto basso (0.1%) e viene, a volte, anche utilizzato al fine di dichiarare l'assenza di OGM in prodotti così detti "OGM

free”. La quantificazione relativa, invece, definisce la quantità di una sequenza target in un campione (campione di controllo o “calibrator”) rispetto ad un altro (campione trattato o “target”). Spesso è usata per misurare il livello di espressione relativa di un gene in un campione prima e dopo un trattamento sperimentale, ad esempio, e il risultato viene espresso come rapporto target/calibrator. Per questa tipologia di analisi, analogamente al precedente, si può usare il metodo delle curve standard, partendo da diluizioni note dei campioni a confronto, anche non avendo gli standard a concentrazione nota e si rapportano i livelli di espressione relativa, esprimendoli come *fold change*.

Esistono diversi modelli matematici per l’analisi dei dati di un esperimento di quantitativa relativa. Uno dei più comunemente usati è il “Comparative Ct method”, detto anche metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Prerequisito per il suo utilizzo è valutare l’efficienza di amplificazione, al fine di verificare che la concentrazione del prodotto PCR raddoppi ad ogni ciclo di PCR durante la fase di crescita esponenziale dell’amplificazione. Tale calcolo si può fare utilizzando la curva standard e applicando la seguente formula:

$$\text{Efficienza} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Se l’efficienza è del 100%, la concentrazione dell’amplicone aumenta 10 volte, ovvero di un fattore logaritmico, ogni 3,3 cicli.



**Figura 1.10-** Se l’efficienza è piena, serie di diluizioni 1 a 10 comportano che tra una diluizione e l’altra ci siano dei  $\Delta Ct$  di 3,3 cicli.

Inoltre, tale metodo è utilizzabile solo previa validazione dell'esperimento ovvero confronto delle efficienze di amplificazione del gene target e del controllo endogeno, per i quali i rispettivi coefficienti angolari (slope) delle rette di interpolazione dei valori di Ct relativi alle diluizioni del campione di partenza, devono essere approssimativamente simili per evitare di generare errori usando tale metodo.

Oltre al "Comparative Ct method", esistono anche il modello Pfaffl *et al* (2001), il modello del Q-gene, quello di Liu e Saint (2002) e il DART-PCR (Peirson *et al*, 2003).

#### 1.4.2.2 Reference Gene Selection (R.G.S.)

La normalizzazione dei dati di espressione genica è usata per correggere le eventuali variazioni che ci possono essere tra un campione e l'altro e che non sono dovute a reali differenze nel livello di espressione genica, tipicamente dovuti ad errori di pipettamento, degradazione di RNA o ad errori nella quantificazione dell'RNA totale. Idealmente, il livello di espressione del controllo interno dovrebbe essere costante in tutti i campioni. I geni cosiddetti "housekeeping", ovvero quei geni costitutivamente espressi per mantenere le funzioni cellulari basali, sono quelli meno influenzati dalle condizioni sperimentali (Butte *et al.*, 2001) e pertanto più utilizzati in letteratura, spesso senza nessun tipo di verifica preventiva. In realtà, un gene "housekeeping" universale non esiste, ovvero valido per tutte le condizioni sperimentali, organi e specie utilizzate. Per tale motivo è necessario validare il gene controllo prima di procedere con la normalizzazione dei dati di real-time PCR. Infatti, alcuni dei più comuni geni utilizzati in letteratura come *reference* (es. gliceraldeide-3-P-deidrogenasi e l'actina) sono risultati nelle nostre analisi inadeguati, in quanto la loro espressione sembra invece variare significativamente in risposta a certe condizioni (Glare *et al.*, 2002), probabilmente, infatti, in aggiunta al metabolismo basale, hanno altre funzioni aggiuntive (Sirover, 1999).

Perciò, i geni *reference* dovrebbero essere selezionati o controllati ogni qualvolta si abbia intenzione di iniziare un nuovo studio che coinvolga una specie, un organo delle condizioni sperimentali o degli stadi di sviluppo differenti.

Questa validazione va sotto il nome di "Reference Gene Selection" (RGS) e ha lo scopo di individuare quei geni che sono solo minimamente influenzati dalle condizioni di interesse, al fine di garantire l'accuratezza dei risultati quantitativi ottenuti. Spesso è inoltre consigliato l'utilizzo di più di un controllo per migliorare l'accuratezza del risultato, utilizzando la loro media geometrica, come riportato da Vandesompele *et al.* (2002). Tradizionalmente, questo approccio parte da una lista dei potenziali housekeeping, basandosi su dati presenti in letteratura.

Nel 2005, una RGS condotta su *Arabidopsis* tramite uno screening sull'intero genoma, ha rivelato che ci sono molti altri geni oltre a quelli tradizionalmente utilizzati come controlli che sono

stabilmente espressi (Czechowsky *et al.*). Recentemente (2007), anche Faccioli *et al.* Hanno selezionato i migliori *reference* in orzo, tramite una ricerca di quei trascritti espressi con costanza nelle diverse librerie a cDNA, tramite un'analisi dei TCs condotta interrogando la piattaforma del TIGR Gene Indices. I limiti più evidenti di questo approccio stanno nel fatto che può essere impiegato solo per quelle specie che dispongono di un numero sufficiente di librerie cDNA e delle sequenze EST corrispondenti organizzate in TCs e che può portare a selezionare sequenze per le quali non è nota la funzione genica. Alcuni software, quali: geNORM (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), bestkeeper (<http://www.genequantification.de>) e Rest (<http://www.gene-quantification.de>), consentono di valutare la stabilità dell'espressione dei *reference* per la normalizzazione dei dati QPCR, indicando un fattore di stabilità per ogni gene candidato, e calcolando un fattore di normalizzazione per ciascun campione basato sulla loro media geometrica (Vandesompele, J. *et al.*, 2002).

### 1.4.3 cDNA AFLP

Tra le analisi su larga scala del trascrittoma, il sequenziamento delle ESTs ha ancora oggi un costo piuttosto elevato. Rispetto al metodo Sanger, tecnica che sfrutta la lettura della sequenza a seguito di una elettroforesi capillare utilizzando nucleotidi “terminatori di catena” associati a fluorocromi base-specifici e che utilizza i sequenziatori di “vecchia generazione”, oggi sono disponibili nuovi metodi di sequenziamento, come il pirosequenziamento, che si basa sulla rilevazione del pirofosfato rilasciato dall'incorporazione di un nucleotide durante la sintesi del DNA. La riduzione dei costi e dei tempi associati ha determinato il suo impiego anche per sequenziamenti massivi di frammenti di RNA tot e il successivo impiego delle sequenze ottenute per il disegno di microarray specifici.

In alternativa, un metodo per ridurre ulteriormente i costi associati all'analisi del trascrittoma, consiste nell'utilizzo di tecniche di analisi di trascritti differenzialmente espressi tra le condizioni di interesse. La teoria alla base è che due o più campioni di RNA totale o messaggero vengono retrotrascritti in cDNA. Sul cDNA ottenuto possono essere poi impiegate tecniche di analisi differenti. L'ibridazione sottrattiva (SSH), ad esempio, sempre più spesso fa riferimento al metodo Clontech della PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction che consiste nell'escludere per sottrazione le sequenze comunemente espresse tra tester e driver ovvero il cDNA che contiene i trascritti differenzialmente espressi di interesse e il cDNA di riferimento e una successiva fase di normalizzazione al fine di identificare anche i trascritti “rari”. Ancora molto utilizzate sono la tecnica di microarray e quella del cDNA-AFLP. Quest'ultima, a differenza della prima, non necessita di array e quindi di dati di sequenza non disponibili per tutte le specie, rendendola molto utile per quelle specie per cui non sono ancora disponibili chip commerciali. I microarray d'altra

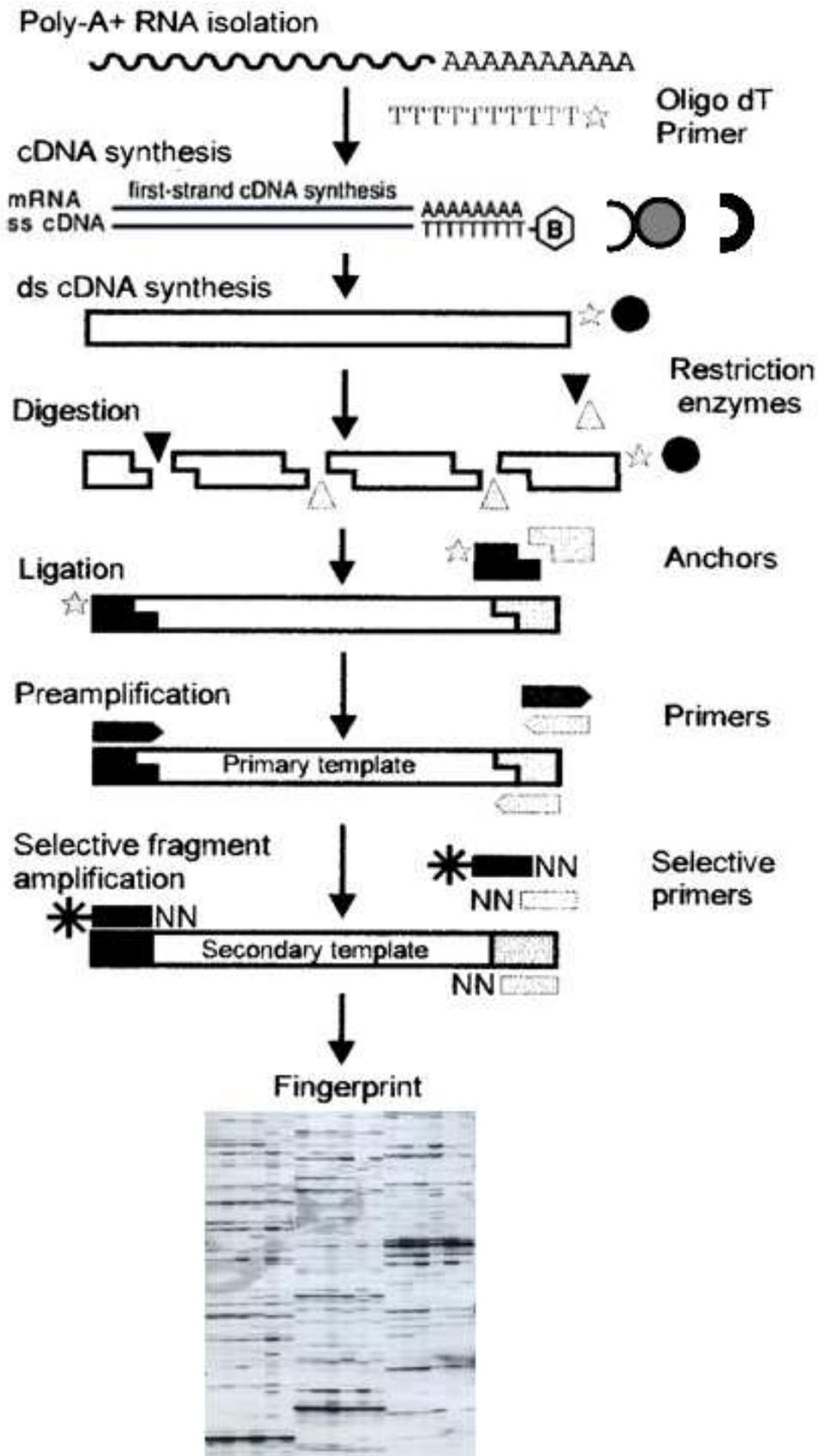
parte sono oggi il sistema più completo per identificare i trascritti la cui espressione è modulata in risposta ad una condizione di interesse. Attualmente i microarray a cDNA hanno lasciato quasi completamente spazio a quelli ad oligonucleotidi che consentono di analizzare i profili di espressione di migliaia di geni contemporaneamente. Il cDNA-AFLP consiste in un RNA fingerprinting che discrimina in base ai polimorfismi di lunghezza dei frammenti ottenuti. E' un'evoluzione del DDRT (Differential Display RT PCR) e consiste sostanzialmente in AFLP sul cDNA.

La figura 1.11 illustra la tecnica del cDNA-AFLP. Il cDNA è sintetizzato a partire dall'RNA messaggero tramite un oligo-dT primer oppure dall'RNA totale (non riportato in figura). Tramite due enzimi di restrizione (un *rare cutter* e un *frequent cutter*) viene quindi digerito. La successiva ligazione con gli adattatori dalla sequenza nota consente poi l'utilizzo di primer specifici costruiti sulla stessa sequenza degli adattatori. L'aggiunta a questi di una o più basi N consente rispettivamente di effettuare una pre-amplificazione con primer con un solo nucleotide selettivo al 3' e una successiva amplificazione selettiva usando primer con due o tre nucleotidi selettivi. Diverse combinazioni di enzimi di restrizione consentono di testare una più ampia porzione del cDNA, mentre diverse combinazioni di primer con più o meno nucleotidi selettivi consentono di ottenere profili più o meno saturi di bande. Gli amplificati vengono quindi separati su gel di poliacrilammide e visualizzati o per *silver staining* o per autoradiografia. Le bande differenzialmente presenti nei campioni messi a confronto rappresentano le porzioni di trascritti differenzialmente espressi.

E' economica e piuttosto riproducibile, impiegabile in tutti i laboratori di biologia molecolare che abbiano a disposizione una PCR e un apparato per l'elettroforesi verticale, e, non necessitando dei dati di sequenza, è pertanto applicabile a qualsiasi sistema biologico. D'altra parte i frammenti ottenuti non sono ovviamente trascritti completi. Inoltre è stata osservata una certa ridondanza, comunque riducibile con il sistema dell'oligo-dT biotinitato.

La tecnica ha il grosso vantaggio di essere potente in quanto permette di osservare molti polimorfismi, anche se consente di avere solo una porzione ristretta del trascrittoma legata alla presenza dei siti di restrizione. Inoltre ha una buona sensibilità legata all'utilizzo della radioattività e all'impiego dell'amplificazione PCR che consente di non perdere i trascritti rari. Un altro grosso vantaggio è che vengono amplificati solo i frammenti con un sito di restrizione rare e un sito di restrizione *frequent*, con il conseguente aumento di probabilità che il TDF appartenga ad una regione interna del trascritto e pertanto codificante.

Sia l'SSH sia il cDNA-AFLP sono già stati impiegati per identificare geni COR in altre specie. Ad esempio Gu *et al* (2004) hanno impiegato la SSH per identificare i geni differenzialmente espressi in *Populus euphratica*, mentre Sun *et al.* (2007) il cDNA AFLP in *Physcomitrella patens*.



**Figura 1.11-** Tecnica del cDNA-AFLP. Immagine riadattata da Bachem *et al.*(1998)

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Materiale vegetale

In questo studio sono state utilizzate due varietà commerciali diploidi ( $2n=18$ ) di *Beta vulgaris L. spp. vulgaris*: la varietà Bianca e la varietà Franca, entrambe acquistate da KWS-SAAT, importante società tedesca nel settore bieticolo. Le due varietà hanno caratteristiche fenotipiche molto simili e condividono una base genetica comune, selezionate successivamente per l'adattabilità ad areali climatici differenti ed alle esigenze delle colture primaverili ed autunnali, rispettivamente.

#### cv.Bianca

Varietà primaverile (A), dotata di grande elasticità produttiva ed idonea anche per una semina precoce, anche il 10-25 febbraio, nel nord Italia. Infatti ha un'elevata energia germinativa e germinabilità. E' caratterizzata da un ottimo equilibrio tra peso e polarizzazione particolarmente adatta per la semina primaverile negli areali settentrionali.

PLV	* * * * *
PSD	* * * * *
PESO RADICI	* * * * *
POLARIZZAZIONE	* * * * *
TOLLERANZA RIZOMANIA	* * * * *
TOLLERANZA CERCOSPORA	* * * * *
EMERGENZA IN CAMPO	* * * * *

**Tabella 2.1** Caratteristiche della cv. Bianca (secondo quanto riportato da KWS SAAT)

#### cv.Franca

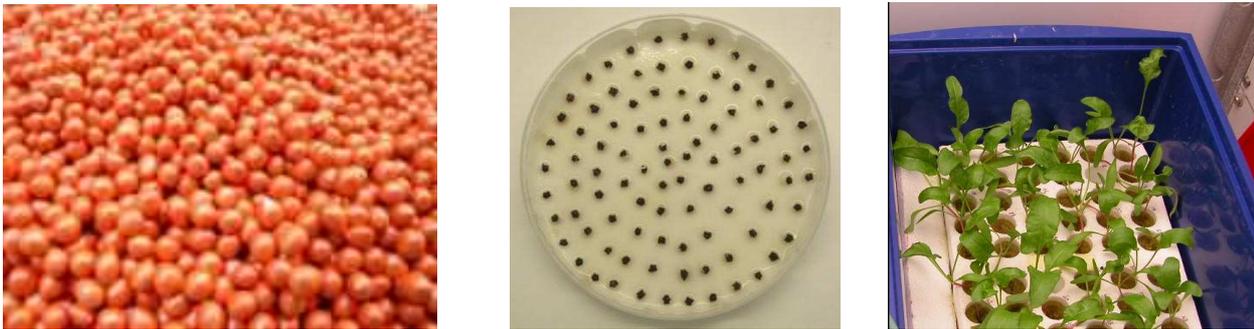
Varietà autunnale (AA), selezionata per gli areali meridionali. Per evitare che l'accumulo di freddo invernale possa portare alla fioritura la primavera successiva (prefioritura), la selezione si è concentrata principalmente sull'innalzamento della soglia di vernalizzazione, caratteristica necessaria ad ogni varietà selezionata per essere utilizzata nella semina autunnale.

PLV	* * * * *
PSD	* * * * *
PESO RADICI	* * * * *
POLARIZZAZIONE	* * *
TOLLERANZA	* * * * *

**Tabella 2.2** Caratteristiche della cv. Franca (secondo quanto riportato da KWS SAAT)

## Preparazione del materiale

I glomeruli monogermi e confettati (figura 2.1a), sono stati lavati ripetutamente in acqua deionizzata al fine di eliminare le sostanze che avvolgono il seme inibendone la germinazione. I semi sono stati quindi depositati al buio in capsule Petri (diametro di 9 cm; figura 2.1b.) su un letto di carta da filtro imbibito con 5ml di acqua deionizzata. Dopo 48 ore, per la varietà Bianca, e circa 72 ore per la varietà Franca, è avvenuta la germinazione (circa l'80% dei semi, per entrambe le varietà). Al momento della fuoriuscita dell'epicotile, i germogli sono stati trasferiti in vassoi di polistirolo con 80 pozzetti riempiti di lana di roccia; i vassoi sono quindi stati posti a galleggiare in vasche idroponiche contenenti 5 litri di soluzione idroponica aerata in continuo mediante 2 gorgogliatori (Vernieri *et al.*, 2001; figura 2.1c).



**a.**

**b.**

**c.**

**Figura 2.1** - Glomeruli della cv. Bianca ancora confettati (a.) e dopo lo sconfeffamento, durante la germinazione in capsule Petri (b.). Coltura idroponica di plantule di 24 giorni (c.).

La soluzione idroponica utilizzata, ideata da Hoagland e poi modificata da Arnon (Hoagland e Arnon; 1950), è stata poi ulteriormente modificata secondo il seguente protocollo: 50 ml soluzione A (macroelementi), 50 ml soluzione B (macroelementi), 5ml di microelementi e 500 µl di Fe-Na EDTA, portando a volume (5 l) con acqua deionizzata. Le ricette delle singole soluzioni sono riportate in tabella 2.3. La soluzione idroponica veniva sostituita 2 volte alla settimana per evitare l'esaurimento dei nutrienti. Le plantule in coltura idroponica sono state quindi fatte crescere in fitotrone in condizioni controllate (fitotrone Sanyo Gallenkamp PLC modello SGC097.CFX.F )

Le condizioni mantenute sino al raggiungimento dello stadio in cui si è applicato lo stress sono:

- temperatura di 19°C/23°C notte/giorno,
- 60% di umidità relativa (RH),
- fotoperiodo giorno:notte di 14:10 (100 µE/m<sup>2</sup>sec di intensità luminosa).

## Macroelementi

### Sol A1:

- <b>KNO<sub>3</sub></b> :	Conc. finale	Stock sol. 100X	2 Litri sol 100X
P.M. 101.11	200 uM	20 mM	4.04 g
- <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x (4H<sub>2</sub>O)</b> :	200 uM	20 mM	6.56 g
P.M. 236.15 – 4x18 = 164.15			

### Sol A2:

- <b>MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b> :	Conc. finale	Stock sol. 100X	2 Litri sol 100X
P.M. 246.5 – 7x18 = 120.5	200 uM	20 mM	4.82 g
- <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	40 uM finale	4 mM	1.09 g
<b>P.M. 136.09</b>			

Sterilizzare a 120°C per 20 min. e conservare a 4°C

## Microelementi

### Sol B:

- <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>Conc. finale</b>	<b>Stock sol. 10000 X</b>	<b>500 ml sol 10000 X</b>
P.M. 61.83	4.6 uM	46 mM	1.4 g
- <b>MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O</b> :	0.91 uM	9.1 mM	0.57 g
P.M. 197.91 – 4H <sub>2</sub> O = 125.91			
- <b>CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b> :	0.036 uM	0.36 mM	0.024 g
P.M. 170.48 - 2H <sub>2</sub> O = 134.48			
- <b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0.086 uM	0.86 mM	0.058 g
P.M. 136.28			
- <b>NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	0.011 uM	0.11 mM	0.011 g
P.M. 241.95 – 2xH <sub>2</sub> O = 205.95			

Non sterilizzare, ma conservare a 4°C

<b>Fe Na EDTA</b>	<b>Conc. finale</b>	<b>Stock sol. 1000 X</b>	<b>500 ml sol 1000 X</b>
P.M. 367.1	10 uM	10 mM	1.83 g

Sterilizzare a 120°C per 20' e conservare a 4°C.

**Tabella 2.3** - Soluzione Arnon-Hoagland (1950) modificata secondo le indicazioni di Rovere (Micropoli)

## 2.2 Trattamento delle piante con basse temperature

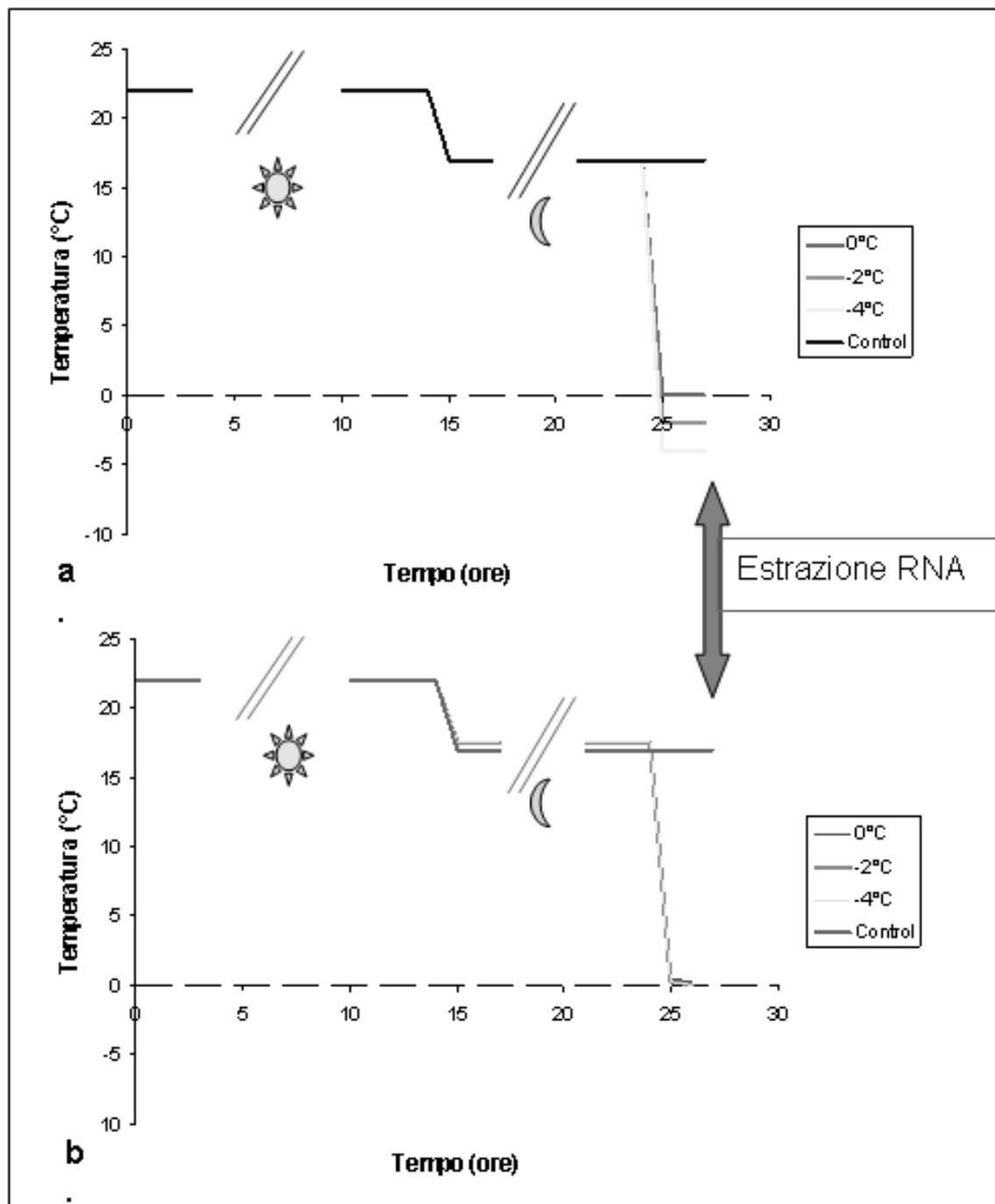
A 24 giorni (stadio 1° palco di foglie vere) dalla semina, i germogli di entrambe le cultivar sono stati sottoposti, alla fine della fase di buio, alle basse temperature (mentre i controlli sono stati mantenuti a 17°C), trasferendo le piantine in vasche pre-equilibrate alla temperatura di saggio in un incubatore a temperatura controllata e mantenendole nelle condizioni scelte per tutta la durata del trattamento termico (Sanyo Gallenkamp PLC Incubator). In ogni esperimento sono stati prelevati i cotiledoni, le foglioline e le radichette di una media di 25 piantine per trattamento, ed ogni esperimento è stato replicato 2 volte. Il sistema sperimentale consiste in 6 esperimenti differenti che comprendono sia esperimenti di shock termico sia esperimenti di graduale acclimatamento alle basse temperature, come riportato in tabella 2.4. Le basse temperature cui sono state sottoposte le plantule delle due varietà sono state 0°C e -2°C, e il periodo di applicazione delle basse temperature è stato di 5 ore, durante le 10 ore della fase notturna (quindi quando le piantine si trovavano a 17°C). Durante ciascun esperimento, i campioni (sia foglia sia radice) sono stati prelevati a 4 tempi diversi sia durante sia dopo il trattamento termico (a 3 ore e a 5 ore dall'inizio del trattamento, e poi a tempi diversi nel corso del periodo di "recovery": 24 ore dopo l'inizio del trattamento termico, 1 settimana dopo). In aggiunta, un trattamento a -4°C per tre ore è stato utilizzato esclusivamente per effettuare la selezione dei migliori *reference* in risposta alle basse temperature in barbabietola da zucchero.

EXP	PERIODO DI CRESCITA	ACCLIMATAMENTO	TEMPERATURE E TEMPI DI ESPOSIZIONE				
			<i>tempi di collezionamento</i>				
			1	2	3	4	
I	23°C/17°C 24 giorni	no	23°C /17°C	↓ 23°C/17°C 5 ore	↓ 23°C/17°C 24 ore	↓ 23°C/17°C 7giorni	↓ cv. Bianca cv. Franca
II	23°C/17°C 24 giorni	6°C/8ore x 3 notti	23°C /17°C	23°C/17°C 5 ore	23°C/17°C 24 ore	23°C/17°C 7giorni	cv. Bianca cv. Franca
III	23°C/17°C 24 giorni	no	0°C/ 3 ore	0°C/ 5 ore	23°C/17°C 24 ore	23°C/17°C 7 giorni	cv. Bianca cv. Franca
IV	23°C/17°C 24 giorni	6°C/8ore x 3 notti	0°C/ 3 ore	0°C/ 5 ore	23°C/17°C 24 ore	23°C/17°C 7 giorni	cv. Bianca cv. Franca
V	23°C/17°C 24 giorni	no	-2°C/ 3 ore	-2°C/ 5 ore	23°C/17°C 24 ore	23°C/17°C 7 giorni	cv. Bianca cv. Franca
VI	23°C/17°C 24 giorni	6°C/8ore x 3 notti	-2°C/ 3 ore	-2°C/ 5 ore	23°C/17°C 24 ore	23°C/17°C 7 giorni	cv. Bianca cv. Franca

**Tabella 2.4** – Schema dei trattamenti cui sono state sottoposte le piante di bietola (4 settimane) per le analisi real-time, cDNA-AFLP e biochimiche.

Mediante questo sistema sperimentale, diverse parti delle piante si trovano soggette a diversi andamenti della temperatura, in maniera del tutto analoga a quanto avviene nella pianta in condizioni di pieno campo. La temperatura settata è quella cui si trova esposta la parte aerea della

pianta, mentre le radici si trovano immerse in una soluzione la cui temperatura minima non scende sotto i  $-0.5^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2.2). Ai tempi indicati in tabella 2.4, sono state raccolte le radici, le foglie e i cotiledoni solo dalle piantine sopravvissute.



**Figura 2.2** - Cicli di temperatura applicati alle piantine di bietola allevate in colture idroponiche. Il periodo di trattamento con basse temperature è stato applicato alla fine di un periodo di buio, e l'RNA estratto ai tempi indicati in tabella 2.4. Mentre la parte aerea delle piante viene in effetti sottoposta alla temperatura settata (a.), le radici, immerse in soluzione di Hoagland, sono soggette a temperature intorno ai  $0/-0.5^{\circ}\text{C}$ , indipendentemente dalla temperatura dell'aria settata sotto lo zero.(b.)

## 2.3 Valutazione del danno da freddo

### 2.3.1. Sopravvivenza

La sopravvivenza, valutata come percentuale di plantule sopravvissute a seguito del trattamento, è stata misurata per ogni temperatura considerata, come media di due esperimenti replicati. Il test  $LT_{50}$  consiste, in particolare, nel valutare la temperatura alla quale il 50% delle piante sopravvive allo stress e quindi nell'individuare la temperatura minima a cui la pianta resiste senza incorrere a danno permanente ( $LT_{50}$ ). Ortiz and Cardemil (2001), definiscono la  $LT_{50}$  come la temperatura a cui si registra il 50 % del danno alla membrana, misurato in base alla conducibilità elettrica dell'acqua contenuta nei tessuti.

### 2.3.2 E.L. (Electrolyte Leakage) Test

Una valutazione preliminare dell'effetto dell'esposizione a basse temperature è stata condotta tramite misurazione del danno cellulare con lo scopo di definire un modello sperimentale idoneo per lo studio molecolare di geni differenzialmente espressi in seguito allo stress da freddo.

Su piante cresciute fino allo stadio di 2-4 foglie vere, sono state excise porzioni di foglia e di radice per condurre l'Electrolyte Leakage Test (E. L. Test), allo scopo di determinare il range di temperature capaci di indurre un certo danno cellulare, da utilizzare nel successivo sistema sperimentale idroponico.

Inizialmente, l'E.L. test è stato condotto a seguito dell'esposizione di interi vassoi di plantule in idroponica alle basse temperature. Abbiamo notato però che in idroponica già durante lo stress le piante rilasciano elettroliti nella soluzione di crescita (Hoagland) in quantità variabile a seconda della temperatura utilizzata. Infatti, abbiamo notato che la conduttività della soluzione ( $EL_{Hoagland}$ ) misurata dopo l'esposizione a diverse temperature aumenta al diminuire della temperatura alla quale effettuiamo il trattamento (figura 2.4).

La valutazione del danno cellulare da basse temperature su tessuto fogliare e radicale della cv. Bianca e della cv. Franca è stata effettuata mediante esposizione diretta di porzioni di tessuto a basse temperature in un bagno criostatico a temperature progressivamente decrescenti, secondo la tecnica adottata da Stone *et al.* (1993). Le temperature a cui sono stati esposti i tessuti per questa prova preliminare sui tessuti delle due varietà sono state le seguenti: 0°C, -2,5°C, -5,0°C, -7,5°C e -10,0°C.

Dopo il trattamento alle basse temperature, il rilascio degli elettroliti, rispetto al contenuto totale di elettroliti, è stato valutato mediante misura conduttimetrica, utilizzando un conduttimetro Orion 3 Star (Thermo Scientific).

Il protocollo che è stato applicato è il seguente:

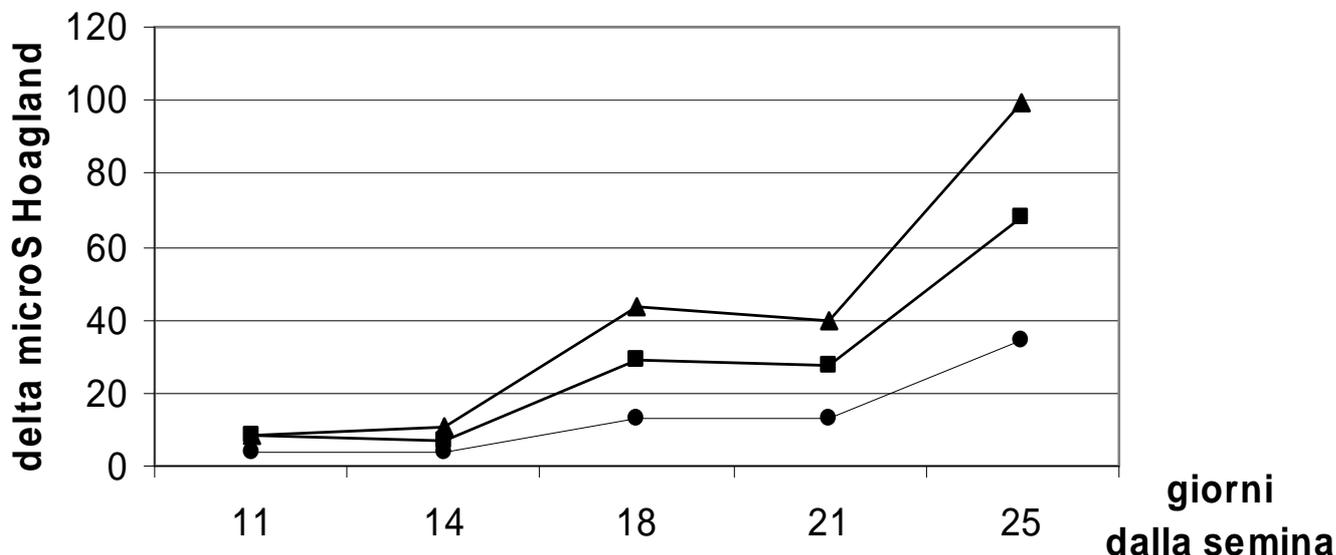
1. sono state excise 12 porzioni da 2-300 mg di tessuto fresco da piante cresciute in condizioni ottimali in camera di crescita e i segmenti di tessuto posti in Falcon da 30 ml;
2. i campioni di controllo sono stati lasciati in ghiaccio, gli altri posti in criostato a 0°C ed a ciascuno è stato aggiunto un granello di ghiaccio;
3. le porzioni di tessuto sono state lasciate a 0°C per 30 min;
4. i campioni trattati sono stati tolti dal criostato e posti in ghiaccio;
5. la temperatura è stata abbassata a -2,5°C con una velocità di diminuzione di 0,5°C ogni 30 min.;
6. dopo 30 min. a -2,5°C, i tubi sono stati tolti dal criostato e posti in ghiaccio;
7. il ciclo è stato ripetuto per gli altri tubi e le altre temperature;
8. dopo l'ultimo trattamento, i tubi sono stati posti a 4°C o/n;
9. sono stati aggiunti 30 ml di acqua distillata a ciascun tubo e i campioni sono stati lasciati a 4°C in agitazione per 4 ore;
10. i campioni sono stati fatti equilibrare a T ambiente per 2 ore prima di leggere la conducibilità del liquido con il conduttimetro (E.L.);
11. tutti i *vials* sono stati autoclavati per 15 minuti ad 1 atm;
12. dopo aver lasciato riequilibrare i campioni a T ambiente, la conduttanza totale è stata letta (E.L. tot.).
13. il leakage indotto dal danno cellulare conseguente l'esposizione del tessuto a basse T viene calcolato come percentuale del valore di E.L. rispetto al contenuto totale di elettroliti (EL tot/autocl). Il calcolo della CMS % e dell'injury index % secondo le seguenti formule (Whitlow *et al* ;1992):

$$REL_T\%=(EL_T/EL_{AUTOCCL}) * 100 ; REL_C\%=(EL_C/EL_{AUTOCCL}) * 100$$

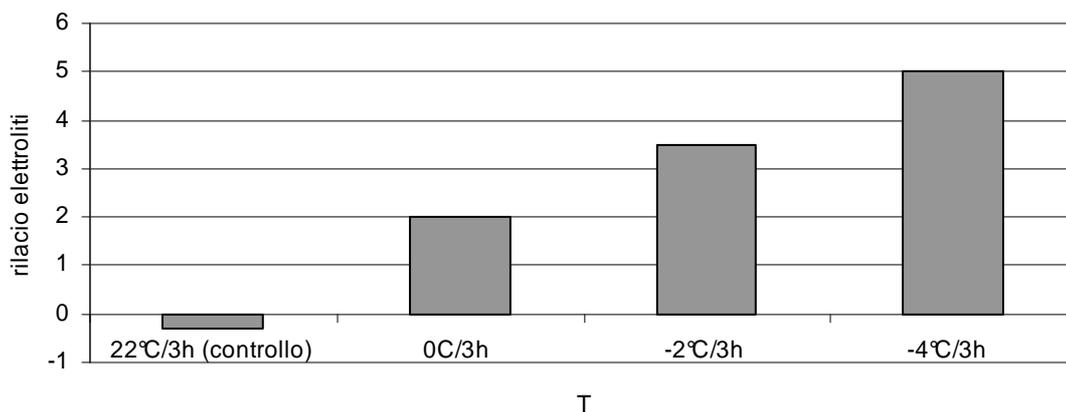
$$I.I.\%=(1-REL_T)/(1-REL_C)*100$$

Queste misure preliminari della suscettibilità dei tessuti alle basse T, e del range di T più adatto ad indurre un effetto fisiologico sono state effettuate su piantine allevate in vaso e non in idroponica perché la valutazione del danno da freddo tramite l'E.L. test su plantule in idroponica trattate con le basse temperature si è rivelata misura non affidabile; la percentuale di perdita di elettroliti, infatti, non è stata trovata variare tra trattati e controlli. La spiegazione è da ricercare nel fatto che in idroponica già durante lo stress le piante rilasciano in parte elettroliti nella soluzione di crescita (Hoagland) in quantità variabile a seconda della temperatura utilizzata. Infatti, è stato notato che la conduttività della soluzione (E.L.-Hoagland) misurata dopo l'esposizione delle piantine in

idroponica a diverse temperature, aumenta al diminuire della temperatura alla quale effettuiamo il trattamento (figura 2.4), segnalando che le radici e gli organi delle piante soggette allo stress perdono elettroliti nel mezzo idroponico, e rendendo impossibile l'effettiva misura dell'E.L. come indicatore del danno cellulare.



**Figura 2.3-** Andamento della conduttività della Hoagland durante la crescita delle plantule misurata in tre vassoi indipendentemente (triangolo, quadrato e cerchio indicano l'andamento in ciascuno dei 3 vassoi). Le misure della conduttività della soluzione Hoagland durante la crescita delle plantule fino al 24-esimo giorno risultano crescenti fino al giorno del trattamento.



**Figura 2.4-** Andamento della conduttività della Hoagland prima e dopo lo stress da freddo. Il rilascio di elettroliti aumenta al diminuire della temperatura. In ascissa, la temperatura (°C) e la durata del trattamento; in ordinata, il rilascio degli elettroliti espresso come  $\Delta\mu_{\text{post-trattamento}} - \mu_{\text{pre-trattamento}}$ .

## 2.4 Analisi della modulazione genica tramite real-time PCR

### 2.4.1 Analisi bioinformatica

A differenza delle specie vegetali di particolare rilievo economico come, ad esempio, il pomodoro, o usate come modello, come *Arabidopsis thaliana*, i database di sequenze di barbabietola da zucchero sono ancora relativamente poco estesi e annotati.

Abbiamo pertanto utilizzato come strategia l'integrazione tra analisi bioinformatiche di Expressed Sequence Tags (ESTs), tramite lo screening di Sugarbeet EST Database (USDA; United States Department of Agriculture) e del TIGR-BvGI (*Beta vulgaris* Gene Index), e analisi sperimentali (approccio "dry/wet"). Gene Indices, appartenente alla piattaforma del TIGR, specifica per la bietola, prende il nome di BVGI (*Beta vulgaris* Gene Index: <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=beet>) e fornisce un'ampia collezione di ESTs, ETs (Expressed Transcripts) e TCs (Tentative Consensus). I trascritti "Expressed Transcript" (ETs) sono disponibili nel database "Expressed Gene Anatomy Database" (EGAD) che contiene sequenze controllate estratte da GenBank (NCBI). I TCs, ovvero trascritti virtuali ad alta fedeltà, sono stati ottenuti da analisi di ESTs e di ETs, utilizzati come "seeds" nel processo di costruzione della sequenza consenso. I *tools* utilizzati sono il software di *clustering* (Paracel Transcript Assembler, PTA), di *assembling* (CAP3) ed di *annotation* (BLAST X, BLAST N). La scelta di operare con TIGR Gene Indices è stata supportata dall'efficienza di tali programmi che portano ad un'analisi stringente e supervisionata. E' stata inoltre sempre controllata l'annotazione ottenuta con quella presente su Gene Ontology. Attualmente, all'ultimo aggiornamento, avvenuto il 19 maggio 2008, BVGI registra 25.906 ESTs, 969 ET, dalla cui analisi bioinformatica risultano 4.784 TC e 17.151 sequenze uniche (comprese le EST e gli ET che non si raggruppano con alcun'altra sequenza). Il BVGI è stato consultato sia tramite scelta dei *pathway* di interesse correlati al carattere resa e qualità del saccarosio e tramite ricerca per parole chiave. Tra tutti i TCs presenti, sono stati selezionati solo TCs annotati con similarità altamente significativa (>80%).

Tra questi, ne sono stati scelti 19 la cui annotazione funzionale è risultata di interesse:

- 7 putativi "housekeeping", tra quelli più comunemente utilizzati quali *reference* in analisi di espressione genica relativa; questa analisi preliminare è stata necessaria dal momento che in letteratura non risultano adeguatamente caratterizzati geni di bietola che potessero svolgere questo ruolo in studi di espressione genica;
- 2 geni noti per rispondere a stress osmotici ma mai studiati in *Beta vulgaris* in risposta al freddo.
- 10 geni codificanti per enzimi chiave associati a vie metaboliche di specifico interesse in quanto importanti per la qualità e la produttività di saccarosio, quali la

glicolisi, il ciclo di Krebs, il ciclo di Calvin, la via dei pentosi fosfati e il metabolismo dei carboidrati complessi (in particolare dell'amido e del saccarosio).

In tabella 2.5, sono riportati: l'accession number (GenBank o BvGI), il numero di EST usate per l'assemblaggio dei TCs, la loro presenza in librerie cDNA tessuto-specifiche fornite da BvGI (L: *leaf*; R: *root*; C: *cotyledon*; S: *whole seedlings*; I: *inflorescence*; n.f.: *not found*). La tabella mostra inoltre la denominazione convenzionale come indicatore della similarità ("homolog to", quando la percentuale di similarità è tra il 90% e il 100% o "similar to" quando la percentuale di similarità è tra il 80% e il 90%).

Nome del gene	Simbolo usato	Accession number	Classe funzionale	Risultati di Blast N	N° ESTs	Tessuto-specificità
Beta-6 tubulina	$\beta$ TUB6	TC56	Organizzazione del citoscheletro	<i>Homolog to Oryza sativa</i>	8	R, S, I
Actina 11	ACT	TC31	Organizzazione del citoscheletro	<i>Homolog to Gossypium</i>	7	R, L, S
Gliceraldeide 3P-deidrogenasi	GAPDH	TC1351	Metabolismo dei carboidrati	<i>Homolog to A.thaliana</i>	32	R, L, S, I
Elongation factor-1 $\alpha$	EF1 $\alpha$	TC1	Sintesi proteica	<i>Homolog to S.rebaudiana</i>	11	R, S
poliubiquitina 10	UBQ	AY056295	Modificazioni post-traduzionali	<i>A. thaliana</i>	-	n.f.
5S RNA	5S	AF161096	Sintesi proteica	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	-	n.f.
18S RNA	18S	X05059, TC24	Sintesi proteica	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	9	R, S, I
Colina monossigenasi	CMO	AF023132	Osmoprotezione	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	-	-
DREB 2A	DREB2A	BQ592254	Trasduzione del segnale	<i>Similar to A. thaliana</i>	2	S
Sugar Beet Saccarosio sintasi 1	SBSS1	AF273253, X81974, TC55	Metabolismo dei carboidrati	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	13	R, L
Sugar Beet Saccarosio sintasi 2	SBSS2	AY457173, TC18	Metabolismo dei carboidrati	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	8	R, L, S
Saccarosio fosfato sintasi 1	SPS1	X81975	Metabolismo dei carboidrati	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	-	-
Saccarosio fosfato sintasi 2	SPS2	TC162	Metabolismo dei carboidrati	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	5	R, L
Piruvato deidrogenasi chinasi	PDHkin	TC1415	Metabolismo energetico	<i>Homolog to Beta vulgaris</i>	5	S, L, R
Rubisco subunità minore1	RBCs1	TC1344	Metabolismo energetico	<i>Similar to S.Oleracea</i>	21	R, L, S, I
Glicolato ossidasi	GLO	TC77	Metabolismo dei lipidi	<i>Similar to S.Oleracea</i>	8	L, R
Endo-1,4-beta-D-glucanasi	GLU	TC7869	Metabolismo dei polisaccaridi	<i>Similar to G. hirsutum</i>	2	R, S

**Tabella 2.5-** Elenco di geni analizzati tramite real-time PCR.

## 2.4.2 Disegno dei saggi real-time PCR

Per poter amplificare le regioni geniche di interesse, si è optato per i saggi TaqMan: Assay on Demand Gene Expression Products (AbD; Applied Biosystems), che comprendono sonde MGB marcate al 5' con FAM). I primers e la sonda di ciascun saggio AbD sono stati disegnati con l'ausilio del software File Builder 3.0. I primers e la sonda sono stati disegnati in modo da ottenere amplificati di dimensioni di circa 60 pb, lunghezza ottimale per l'amplificazione con real-time PCR, e tenendo in considerazione le giunzioni esone-esone in quanto, nonostante il trattamento con la DNAasi, è possibile che vi siano contaminazioni di DNA genomico, che in questo modo non possono fungere da templatolo nel processo di amplificazione.

Per potere effettuare la ricerca delle giunzioni esone-esone è stato impiegato il programma Multalin (<http://bioinfo.genopoe-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>), al fine di evidenziare le putative regioni esone-esone tramite allineamento multiplo di TCs, ESTs o CDS con l'analogha sequenza genomica di *Arabidopsis thaliana* o di altre specie (figura 2.5).



**Figura 2.5-** Esempio di allineamento con il software Multalin. Allineamento tra TC1351, AT1G13440 e il corrispondente *cds*, al fine di trovare le giunzioni esone esone ( nei box rossi) utili per il disegno dell' Assay by Demand.

Nella sezione dei Risultati sono invece elencate le sequenze di tutti i primers e le sonde impiegati nelle analisi real-time PCR.

### 2.4.3 Estrazione dell'RNA totale

Per minimizzare la degradazione di RNA, è stato necessario utilizzare alcuni accorgimenti, tra cui sterilizzare la vetreria, mortai e pestelli in stufa a 170°C per 2 ore, ed utilizzare materiale plastico (puntali, provette, etc..) sterile ed *RNase-free* e usare sempre guanti in lattice per evitare di contaminare il materiale con RNAasi presenti sulla superficie delle mani. In molti casi è stata utilizzata acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC), inibitore delle RNAasi, per preparare i tamponi.

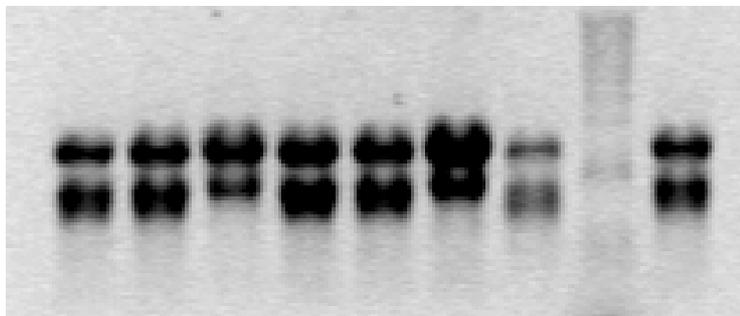
Il metodo riportato successivamente è stato utilizzato per l'analisi della modulazione dell'espressione genica per il quale ha dato, in tempi brevi, ottimi risultati, in quanto è stato necessario estrarre da un numero elevato di campioni solo pochi microgrammi di RNA totale di ottima qualità. Al contrario, non è risultato il migliore per le necessità del cDNA-AFLP che ha richiesto l'estrazione solo da pochi campioni (6), per i quali risultava però necessario ottenere elevate quantità di RNA totale, e per il quale quindi si è optato per l'estrazione fenolo-cloroformio, come riportato in seguito.

Ogni campione di tessuto deriva dal *pool* di 25 plantule cresciute in soluzione idroponica. Pool di foglie e di radici sono stati separatamente collezionati per i 6 trattamenti sperimentali condotti, e per l'intero *time-course* dell'esperimento (vedi tabella 2.4). Si è proceduto allo stesso modo sia per la cv. Bianca sia per la cv. Franca per un totale di 120 campionamenti. I campioni sono stati polverizzati tramite pestellamento in azoto liquido, e l'RNA totale estratto con RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Germania), seguendo il protocollo fornito dalla ditta con alcune semplici modifiche che hanno permesso di migliorare la resa per l'estrazione dalla radice: non abbiamo infatti effettuato l'incubazione a 56°C per 1 min prevista dal protocollo durante la prima fase di estrazione, abbiamo aggiunto un'incubazione di 1 minuto prima di ogni centrifugata e abbiamo raddoppiato il primo lavaggio con 500µl del buffer RPE. L'RNA totale, risultato di elevata qualità, è stato eluito dalla colonnina con 40 µl di acqua RNase-free.

I campioni di RNA sono stati quantificati sia tramite lettura spettrofotometrica a 260nm/280nm, sia su gel tramite confronto con uno standard a quantità nota (plasmide pUC19 linearizzato, Fermentas International Inc, Lituania).

Al fine di controllare la bontà dell'estrazione, l'RNA totale estratto da ciascun campione è stato inoltre corso su gel denaturante di formaldeide e tampone MOPS (acido 3-(N-morfolinopropansulfonico) all' 1% di agarosio (Invitrogen, USA, Sambrook *et al.*, 1989). I campioni, prima di essere caricati nei pozzetti, sono stati denaturati a 65°C per 10 minuti in loading buffer (0,5ml di loading buffer 2X: 100µl di MOPS 10X, 166µl di formaldeide, 231µl formamide, 1µl di bromuro d'etidio e Blu di Bromofenolo).

L'elettroforesi (figura 2.6) è stata effettuata a 5,5 volts/cm, in tampone MOPS 1X, 2% di formaldeide quindi il gel è stato fotografato con una videocamera a UV (BioRad, USA). Come marcatore di riferimento è stato utilizzato il ladder 1 Kb plus, alla concentrazione di 100 ng/μl (Invitrogen, USA).



**Figura 2.6-** Elettroforesi in gel denaturante di campioni di RNA totale.

Una lettura al fluorimetro (QuBit, Invitrogen) associato al kit RNA assay Kit (Invitrogen) è stata inoltre condotta per quantificare con elevata accuratezza e precisione i campioni necessari per effettuare la “Reference Gene Selection”.

#### **2.4.4. “Two-steps” real-time PCR**

La real-time PCR è attualmente lo strumento più affidabile, accurato, sensibile e riproducibile presente oggi sul mercato per l’analisi quantitativa dell’espressione genica. Al fine di evitare un’amplificazione aspecifica del DNA genomico e la comparsa di falsi positivi, 3 μg di RNA totale sono stati retrotrascritti con 3 unità di RNase-free DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) in un volume finale di 100 μl e incubazione in termociclatore secondo il seguente programma: 25°C per 10 minuti, 37°C per 120 minuti.

Abbiamo optato per una *two-steps* real-time PCR, perché più sensibile e con meno problemi di degradazione di RNA (Wong e Medrano, 2005). La retrotrascrizione in cDNA è stata effettuata usando random primers forniti nell’High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) in associazione con l’inibitore di RNAasi (RNAasi OUT, Invitrogen) e i campioni sono poi stati portati alla concentrazione di 4 ng/μl.

Le concentrazioni utilizzate in un volume finale di 20 μl sono state:

1X Taqman Universal PCR Master Mix,

1X AbD (Assay by Design product)

20 ng di cDNA.

Ogni campione è stato amplificato in triplicato.

Il programma di amplificazione è stato il seguente:

50°C per 2 min.,

95°C a 10 min.,

40 cicli a 95°C per 15 sec e 60°C per 1 min.

Le analisi sono state eseguite impiegando la tecnologia TaqMan, nella quale le sonde hanno come reporter un fluorocromo del tipo FAM, e sono state utilizzate piastre ottiche da 96 pozzetti e una real time ABI PRISM 7000 System (Applied Biosystems).

Su ogni piastra sono stati inoltre caricati i seguenti controlli negativi:

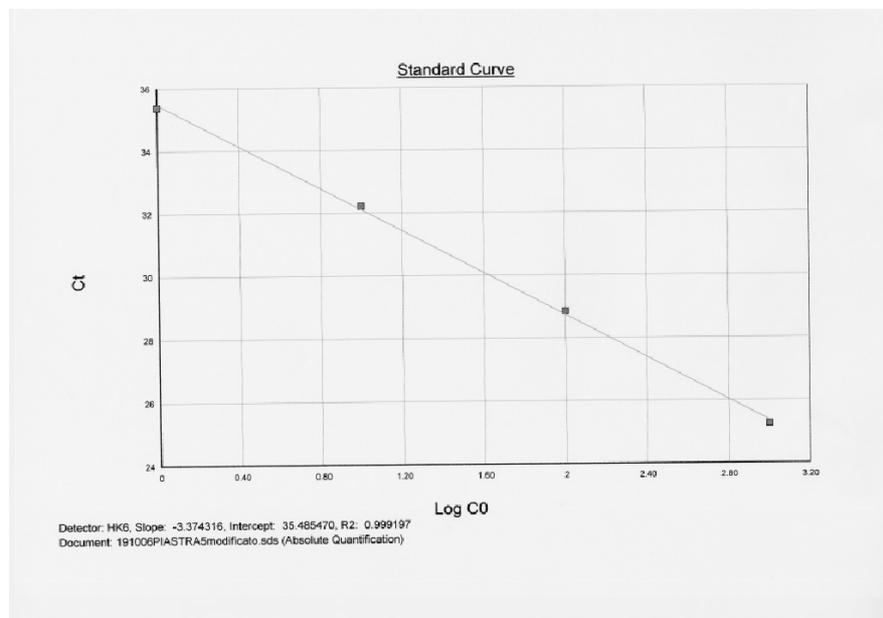
- RT minus (assenza di amplificazione di eventuale RNA contaminante)
- NTC (no template control).

I valori di Ct associati ad ognuno dei 96 campioni caricati, elaborati dal software SDS v1.3 (Sequence Detection Software, Applied Biosystems), sono stati esportati e analizzati su fogli di lavoro Excel, eccetto per dati di Ct > 45, perché relative a quantità di sequenza target troppo basse per essere significative. Oltre alla valutazione delle medie delle repliche e della deviazione standard associata, tramite il test di Grubb's sono stati individuati ed eliminati dal dataset gli outliers, ovvero quei valori significativamente "distanti" dagli altri.

Tramite 4 diluizioni seriali 1:10 del cDNA stampo, è stato possibile stimare l'efficienza di amplificazione associata ad ogni saggio sia su foglia sia su radice (Radonic et al., 2004).

Tale efficienza viene calcolata come funzione della pendenza della curva standard (*slope*), secondo la formula:

$$E = (10^{-1/SLOPE} - 1) * 100$$



**Figura 2.7-** Esempio di curva standard

Tanto più lo *slope* tende a -3.32, tanto più l'efficienza risulterà vicina a 1. Tutte le reazioni di PCR effettuate hanno mostrato efficienze molto alte, consentendo in questa fase preliminare di

validare il metodo del  $\Delta Ct$ , e poter confrontare le molteplici real-time PCR effettuate su geni e tessuti diversi. E' stato inoltre calcolato il coefficiente di regressione lineare ( $r^2$ ).

Sono state quindi misurate sia la variabilità *intra-assay* che *inter-assay*, rispettivamente come deviazione standard dei valori di Ct riportate per le tre repliche tecniche associate a ciascun campione soggetto ad analisi nella stessa piastra di reazione (*intra-assay*), e come coefficiente di variazione (CV%) tra le efficienze calcolate su PCR condotte su piastre diverse (*inter-assay*). Ogni saggio è stato controllato almeno una volta su gel di agarosio al 4% per verificare la corrispondenza tra dimensione della regione su cui è stato costruito l'AbD e l'amplicone effettivamente amplificato

Gene	Calibrator					Stress 0°C				
	Ct1	Ct2	Ct3	devstd	MEDIA	Ct1	Ct2	Ct3	devstd	MEDIA
GAPDH	28.12	28.01	28.05	0.06	28.06	21.10	21.10	21.10	0.00	21.10
TUBULINA	26.93	26.98	27.00	0.04	26.97	23.04	22.92	22.96	0.06	22.97
ACTINA	25.85	26.12	25.90	0.14	25.96	20.79	20.67	20.91	0.12	20.79
RNA18S	11.39	11.44	11.40	0.03	11.41	9.06	8.87	9.07	0.11	9.00
RNA 5S	17.23	17.18	17.20	0.03	17.20	16.35	16.40	16.31	0.05	16.35
Gene	Stress -2°C					Stress -4°C				
	Ct1	Ct2	Ct3	devstd	MEDIA	Ct1	Ct2	Ct3	MEDIA	devstd
GAPDH	21.63	21.45	21.49	0.09	21.52	27.47	27.43	27.38	25.47	0.05
TUBULINA	23.15	23.15	23.06	0.05	23.12	27.02	27.01	26.99	25.72	0.02
ACTINA	21.22	21.10	21.18	0.06	21.17	26.62	26.70	26.91	24.83	0.15
RNA18S	8.04	7.98	8.08	0.05	8.03	9.68	9.55	9.72	9.09	0.09
RNA 5S	15.70	15.84	15.57	0.13	15.70	18.24	18.35	18.24	17.43	0.06

**Tabella 2.6-** Esempio di “data sheet”. *Dev.Std.*  $\leq 0.3$  (A. Biosystems User Bulletin)

#### 2.4.5. “Reference Gene Selection”

La misura del livello di uno specifico trascritto può essere effettuata tralasciando la fase di normalizzazione, tramite una quantificazione poco accurata in quanto, per esempio, suscettibile di errori nella misura della quantità di template utilizzato, oppure tramite quantificazione relativa normalizzata su RNA endogeni amplificati insieme ai geni target ma con la differenza di avere un'espressione stabile nelle condizioni analizzate.

La selezione di uno o più geni *housekeeping*, da impiegare come geni di riferimento (*reference*) nella fase di normalizzazione dei dati real-time PCR, rappresenta una fase preliminare necessaria per l'ottenimento di qualsiasi risultato di espressione relativa che comporti conclusioni robuste e riproducibili.

Abbiamo pertanto scelto 7 geni fra quelli più comunemente utilizzati in letteratura come *reference* in altre specie, al fine di selezionare quelli la cui espressione genica rimane più costante nelle condizioni/organo da noi considerati:

- gliceraldeide-3-P deidrogenasi,
- beta-6 tubulina
- actina 11
- rRNA 18S
- rRNA 5S
- poliubiquitina 10
- elongation factor 1 alfa

La “Reference Gene Selection” è stata condotta sia per valutare i migliori *reference* nel confronto tissutale (foglia, radice e cotiledone), sia per selezionare i migliori *reference* nell’analisi controllo/stressato, ed è stata effettuata esclusivamente utilizzando la cv. Bianca.

Analisi *two steps* real-time PCR sono state effettuate su 12 campioni, collezionati dopo un trattamento di 5 ore rispettivamente a 0°C, -2°C o -4°C.

Nella RGS, si è preferito aggiungere due condizioni in più, rispetto alle successive analisi di modulazione di espressione genica dei geni target di interesse, ovvero un trattamento a -4°C e un tessuto (il cotiledone) al fine di rendere più “ampia” ed estensibile la scelta dei migliori *reference*.

Le sonde AbD (AB) sono state disegnate su sequenze di *Beta vulgaris*, ad eccezione della poliubiquitina 10 disegnata su regioni conservate di *Arabidopsis thaliana* (AY056295). Inoltre, per i primi tre sono state utilizzati sequenze TCs, rispettivamente il TC1351, il TC56 e il TC31, mentre per i trascritti ribosomiali sono state utilizzate rispettivamente le accessioni Genbank X5059 e AF161096, come riportato nella tabella 2.5.

La variabilità di espressione dei geni “housekeeping” putativi è stata valutata con diverse strategie, come riportato in figura 2.8, finalizzate sia all’analisi dell’espressione relativa nei tre tessuti considerati sia all’analisi dell’espressione relativa nelle condizioni di trattamento termico considerate, ed in particolare:

- confronto diretto dei valori Ct, valutando i coefficienti di variazione (CV%; Pfaffl *et al.*, 2001; Oppenheimer *et al.*, 1988);
- confronto degli intervalli di Ct relativi a ciascun gene, ovvero in termini di  $\Delta Ct$  calcolato per ogni gene e per ogni condizione sperimentale ( $Ct^{\max} - Ct^{\min}$ ; Radonic *et al.*, 2004);
- metodo del  $2^{-\Delta Ct}$  (Faccioli *et al.*, 2007; Livak and Schmittgen, 2001), ovvero il calcolo del *fold change* messo in relazione con il valore minimo riportato per il gene di interesse nelle condizioni/tessuto preso in considerazione.

#### 2.4.6 Quantificazione relativa nell'analisi della modulazione dell'espressione di alcuni geni di interesse legati al carattere CSY

L'espressione dei 12 geni target (SBSS1, SBSS2, SPS1, SPS2, FbPase, FbPald, PDHkin, GLO, Rbcs1, DREB2A, CMO, GLU, vedi tabella 2.5) è stata analizzata per confrontare i livelli di trascritti nei due organi (foglia e radice), in condizioni di crescita ottimale, al fine di valutare un'eventuale espressione differenziale tessuto-specifica. In aggiunta, la loro espressione è stata valutata dopo l'esposizione a basse temperature (0°C e -2°C) in foglia e radice.

Il sistema sperimentale è descritto nella tabella 2.4 e riportato nei paragrafi precedenti. Il valore di Ct medio tra le tre repliche è stato calcolato, e la normalizzazione è stata effettuata rispetto ai geni *reference* risultati migliori in seguito all'analisi RGS. I *calibrator* usati per le quantificazioni relative sono: foglia (nell'analisi organo-specifica) e foglia o radice non trattati nell'analisi di confronto relativo trattato/controllo.

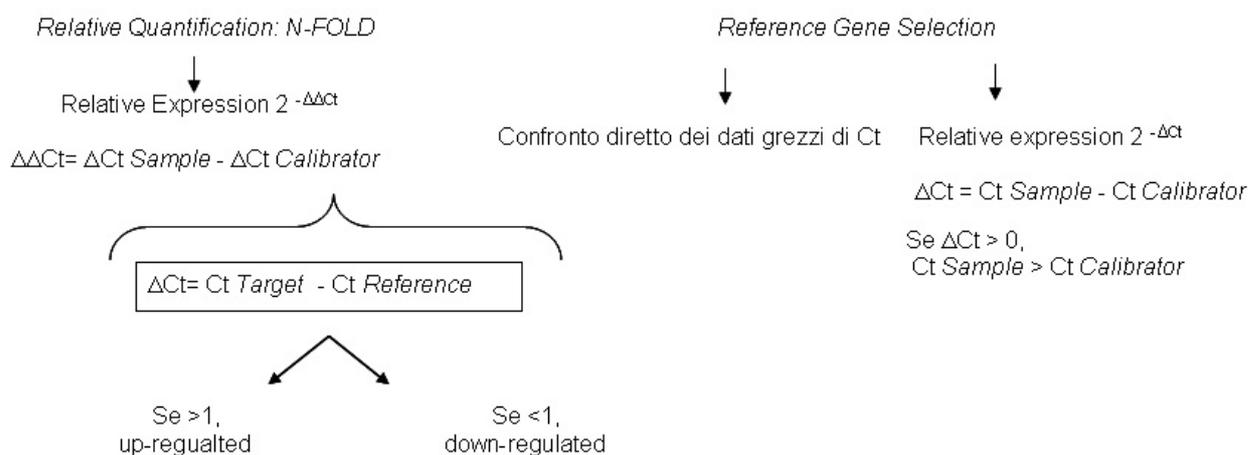
In accordo con Pfaffl *et al* (2001) e Livak e Schmittgen (2001), il livello di espressione relativa, chiamato anche *fold change*, è stato calcolato con il "Comparative Ct method" (figura 2.8):

$$\Delta Ct_{\text{target (trattato-calibrator)}} = Ct_{\text{Medio (gene target nel campione stressato)}} - Ct_{\text{Medio (gene target nel campione controllo)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{reference(trattato-calibrator)}} = Ct_{\text{Medio(gene ref. nel campione stressato)}} - Ct_{\text{Medio(gene ref. nel campione controllo)}}$$

$$\text{Espressione relativa} = E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target (trattato-calibrator)}}} / E_{\text{reference}}^{\Delta Ct_{\text{reference (trattato-calibrator)}}}$$

Se l'efficienza di amplificazione è approssimabile al 100%, l'espressione relativa è approssimabile a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . I valori ottenuti sono stati controllati per significatività statistica tramite P-value e deviazione standard del  $\Delta\Delta Ct$ , in accordo con Yuan *et al.* (2006).



**Figura 2.8-** Schema riassuntivo dell'analisi di espressione relativa tramite il Comparative Ct Method

## 2.5. Analisi del trascrittoma mediante cDNA-AFLP

### 2.5.1. Estrazione dell'RNA totale

Foglie e radici di plantule della cv. Bianca sottoposte a trattamento termico a 0°C/3ore e -2°C/3ore (ovvero gli esperimenti numero 1, 3, e 5 al prelievo 1) sono stati impiegati per l'analisi cDNA-AFLP.

Il protocollo di estrazione dell'RNA totale (Bachem *et al.*, 2002) prevede due fasi:

1. lisi cellulare in condizioni ottimali per l'inibizione dell'attività ribonucleasica e rimozione delle proteine denaturate;
2. precipitazione selettiva con LiCl per separare l'RNA dalle altre componenti cellulari.

#### Soluzioni e reagenti

1) H<sub>2</sub>O DEPC 0,1% sterile (da adoperare per tutte le soluzioni)

2) RNA extraction buffer

Tris 100mM

LiCl 100mM

EDTA 10mM

SDS 1%

portare a pH=8,0 ed autoclavare

3) LiCl 8M (conservare a -20°C)

4) Na Acetato 3M (temperatura ambiente)

5) Fenolo saturo in Tris

- 6) Cloroformio
- 7) Etanolo 75% e 96%

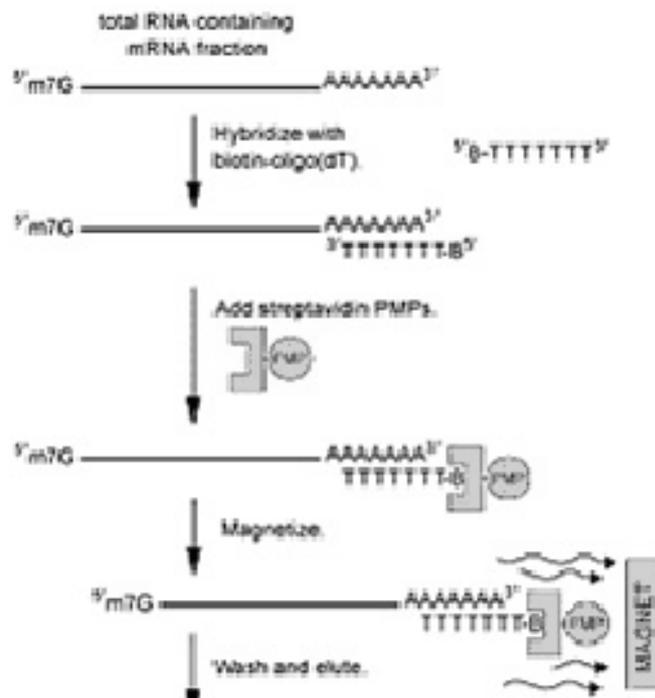
Per il protocollo di estrazione, si è proceduto come segue:

1. Scaldare il buffer di estrazione in un bagnetto termico 80°C
2. Polverizzare il materiale vegetale con azoto liquido in un mortaio pre-raffreddato (N.B. è fondamentale che il tessuto non si scongeli mai durante questa fase) e trasferirlo in un tubo di polipropilene da 50ml e lasciare evaporare tutto l'azoto liquido.
3. Solo dopo che tutto l'azoto è evaporato, aggiungere 5ml di fenolo e 5ml di buffer di estrazione (80°C). N.B. la presenza di tracce di azoto può compromettere le fasi successive.
4. Agitare manualmente e poi con agitatore orbitale per 10 min.
5. Centrifugare a 3500 rpm per 20 min a temperatura ambiente.
6. Prelevare il surnatante e trasferirlo in tubi da 50 ml puliti.
7. Aggiungere 5ml di cloroformio e ripetere l'estrazione almeno due volte finchè l'interfase non risulta trasparente (punti 3,4,5).
8. Prelevare il surnatante e trasferirlo in tubi da 50 ml puliti. A questo punto è possibile congelare O/N a -20°C.
9. Aggiungere LiCl 8M pari ad 1/3 del volume del surnatante recuperato. E precipitare per almeno 3 ore a 0°C (oppure O/N).
10. Centrifugare a 3500 rpm per 20 min 0°C ed eliminare il sovrnatante.
11. Lavare il pellet con 1 ml di etanolo 75% (DEPC) per 3 volte consecutive; al termine di ogni lavaggio centrifugare per 20 min a 0°C ed eliminare l'eccesso di etanolo seccando il pellet per 10-15 min a vuoto (speedvac senza centrifuga).
12. Risospendere il pellet con 500 µl di H<sub>2</sub>O DEPC sterile ed utilizzare 1 µl per quantificazione allo spettrofotometro.
13. Precipitare l'RNA con 1 ml di etanolo al 96% e 1/10 del volume di Na Acetato 3M a -20°C/1ora oppure 0°C/2ore.
14. Centrifugare a 3500 rpm per 20 min 0°C ed eliminare il sovrnatante.
15. Seccare il pellet e risospendere in una quantità tale di H<sub>2</sub>O DEPC da raggiungere la concentrazione di 1µg/µl.
16. Dopo aver trasferito l'RNA in un eppendorf da 2ml congelare velocemente per immersione in azoto liquido, conservandolo poi a -80°C.
17. La quantificazione dell'RNA totale e la determinazione della purezza sono state eseguite come riportato nel paragrafo 2.4.4.

### 2.5.2. Isolamento dell'RNA messaggero e retrotrascrizione

Il mRNA è stato isolato a partire da 250-300µg di RNA totale per campione, mediante il sistema PolyATtract System III (Promega). Questo sistema, evitando l'utilizzo di colonne di cellulosa oligo-dT, sfrutta l'affinità streptavidina-biotina basandosi sull'impiego di oligo-dT biotinilati che vengono aggiunti alla soluzione di RNA ibridizzando specificatamente con la regione poly(A) presente al 3' della maggior parte di mRNA maturi eucariotici. La successiva aggiunta di particelle paramagnetiche legate a molecole di streptavidina (MagneSphere Streptavidin Paramagnetic Particle; SA-PMPs) e formazione del complesso con la biotina, consente l'isolamento dell'mRNA grazie all'utilizzo di un supporto paramagnetico in grado di attrarre le SA-PMPs (Magnetic Stand).

Il protocollo segue quanto riportato dal manuale del kit e si divide in una prima fase di annealing dell'mRNA, lavaggio delle SA-PMPs e cattura degli mRNA biotinilati (figura 2.9).



**Figura 2.9-** Fasi dell'isolamento dell'mRNA con il sistema PolyATtract System III (Promega). Tratto da: *Promega Notes Magazine* Number 60, 1996, p. 14

Dopo aver lavato le PMPs con 50µl di First Strand buffer 1X, catturando le particelle ed eliminando il surnatante, la sintesi del cDNA *double strand* è stata effettuata usando il kit "Superscript II Double stranded cDNA Synthesis Kit" (Invitrogen), a cui abbiamo apportato alcune lievi modifiche. 30 µl di miscela di reazione 1<sup>nd</sup> strand contenente 400 unità di Superscript II sono stati aggiunti alle PMPs. Dopo un'incubazione di 1 ora a 42°C , abbiamo aggiunto 120 µl della

miscela di reazione 2<sup>nd</sup> strand contenente 40 unità di DNA Polimerasi I, a cui è seguita un'incubazione di 3 ore a 16°C.

### 2.5.3 Protocollo cDNA AFLP

Al fine di identificare nuovi trascritti espressi in modo differenziale in *Beta vulgaris* sottoposta a shock termico, è stata utilizzata la tecnica del cDNA-AFLP. Questa tecnica, basata sulla restrizione del cDNA e sulla produzione di TDFs (Transcribed-Derived Fragments), consente di ottenere dei pattern di espressione che rivelano differenze qualitative (presenza-assenza di un TDF) e quantitative (intensità relativa delle bande) tra campioni a confronto. Il protocollo utilizzato segue quanto riportato da Bachem *et al.* (1998); al fine di migliorare la qualità dei pattern, l'interpretazione dei profili d'espressione e facilitare il corretto recupero dei frammenti differenziali, sono state adottate alcune modifiche al protocollo classico di cDNA-AFLP. Abbiamo infatti utilizzato substrati paramagnetici come supporto fisico del cDNA durante tutte le fasi che vanno dall'isolamento del mRNA sino alla ligazione degli adattatori (vedi paragrafo 3.4.2). Questo sistema riduce la probabilità di tagli multipli, producendo mediamente un unico TDF per trascritto, e rende in linea di principio possibili anche delle valutazioni di tipo quantitativo. Inoltre al fine di garantire uno spostamento del range dei pesi molecolari ottenuti dalla restrizione verso valori più alti, abbiamo utilizzato la coppia di enzimi di restrizione *BstY I/Mse I* (New England Biolabs, U.S.A.; Breyne *et al.*, 2003).

Dopo aver effettuato la retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA a doppio filamento la prima fase del protocollo cDNA-AFLP è la digestione con enzimi di restrizione al fine di ottenere brevi frammenti con estremità piatte, ideali per il legame con gli adattatori (Figura 1.11).

La digestione del cDNA è stata effettuata usando come enzimi di restrizione un *rare cutter*, l'enzima *BstY I*, che riconosce una regione di 6 pb (6-cutter), ed un *frequent cutter*, *MseI*, che riconosce una regione di 4 pb (4-cutter), al posto di *Ase I* e *Taq I*, usati nel protocollo originale di Bachem (1998).

#### Digestione con *BstY I*

Acqua UP	34 µl
NEB Buffer 2 (10X)	4,0 µl
<u><i>BstY I</i> (10U/µl)</u>	<u>2,0 µl</u>
Totale	40 µl

1. Incubare a 60°C per 1 ora in bagno termostatico;
2. Catturare le PMPs ed eliminare il sopranatante;

3. Lavare con 50µl del Buffer 1X del secondo enzima di restrizione
4. Aggiungere la mix della seconda digestione

Digestione con *Mse I*

Acqua UP	33,6 µl
NEB Buffer 2 (10X)	4,0 µl
BSA 100X	0,4 µl
<u><i>MseI</i> (10U/µl)</u>	<u>2,0 µl</u>
Totale	40 µl

5. Incubare a 37°C per 1h in bagno termostatico;
6. Catturare tutte le PMPs e prelevare solo il sopranatante che viene trasferito in un tubino Eppendorf da 1,5 ml al fine di rimuovere ogni particella magnetica residua;
7. Catturare nuovamente le particelle magnetiche, prelevare il sopranatante e trasferirlo in un tubino da PCR.

La ligazione con gli adattatori e le successive reazioni di amplificazioni sono state condotte su un termociclatore PTC-100 (MJ Research, USA).

Le sequenze degli adattatori sono riportate nella tabella 2.7.

Nome	Sequenza
B-BSTY top	CTCGTAGACTGCGTAGT
B-BSTY bottom	GATCACTACGCAGTCTAC
MSE adaptor top	GACGATGAGTCCTGAG
MSE adaptor bottom	TACTCAGGACTCAT

**Tabella 2.7-** Elenco sequenze adattatori utilizzati per il cDNA-AFLP

Ligazione degli adattatori

Ligase Buffer 5X	11,0 µl
ATP (100mM)	0,5 µl
<i>T4 DNA Ligase</i>	1,0 µl
<i>Adapter f.c.</i> (50 pM)	1,0 µl
<i>Adapter r.c.</i> (5 pM)	1,0 µl
<u>Template</u>	<u>40,0 µl</u>
Totale	54,5 µl

Incubare in termociclatore secondo il programma 37°C per 3h; 4°C per 12h.

Le sequenze dei primers , complementari in parte alla sequenza dell'adattatore in parte al sito di restrizione, durante la fase di pre-amplificazione non presentano alcun nucleotide selettivo e sono riportate in tabella 2.7.

Preamplificazione

Acqua UP	36,5 µl
Buffer Kit 10X	5,0 µl
Bst I -00 (50ng/µl)	2,5 µl
Mse I -00 (50ng/µl)	2,5 µl
PCR Nucleotide mix	1,0 µl
PWO SY DNA Pol. (5U/µl) 0,5 µl	
<u>Ligato t.q.</u>	<u>2,0 µl</u>
Totale	50 µl

Effettuare 15 cicli di amplificazione: 94°C per 30"; 56°C per 30", 72°C per 60", 4°C per 12h.

Controllare gli amplificati (4-5 µl) su gel di agarosio 0,8%;

Diluire i pre-amplificati 1:50-1:60.

B-B0	GACTGCGTAGTGATC	
B-B0-T	GACTGCGTAGTGATCT	BT
MO	GATGAGTCCTGAGTAA	
M0-CGA	GATGAGTCCTGAGTAACGA	MC13
M0-CGC	GATGAGTCCTGAGTAACGC	MC14
M0-AAA	GATGAGTCCTGAGTAAAAA	MA5
M0-AAC	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	MA6
M0-GAA	GATGAGTCCTGAGTAAGAA	MG5
M0-GAC	GATGAGTCCTGAGTAAGAC	MG6
M0-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA	MC5
M0-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC	MC6
M0-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG	MC7
M0-CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT	MC8

**Tabella 2.8** - Sequenze dei primers utilizzati per l'analisi cDNA-AFLP

10 combinazioni di primers *BstY I*, marcati in 5' con  $^{33}\text{P}$ , e *MseI* con un'estensione selettiva rispettivamente di 1 o 3 nucleotidi, sono state utilizzate per analizzare il trascrittoma di campioni di foglia e radice sottoposti a regime di basse temperature (tabella 2.8).

Prima di eseguire la successiva amplificazione selettiva, il successo della preamplificazione è stato verificato mediante una corsa su gel di agarosio al 2%. L'avvenuta preamplificazione è visualizzabile con una striscia più o meno continua di DNA a basso peso molecolare. In base all'intensità del segnale viene ottimizzato il rapporto di diluizione per la miscela di pre-amplificazione.

Marcatore primer (rare cutter primer)

Acqua UP	23 $\mu\text{l}$
Primer (50 ng/ $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$
PNK buffer 10X	5,0 $\mu\text{l}$
$\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$
<u>T4 PNKinase (Roche)</u>	<u>2,0 <math>\mu\text{l}</math></u>
Totale	50 $\mu\text{l}$

Incubare a 37°C per 1h

Conservare direttamente a -20 °C.

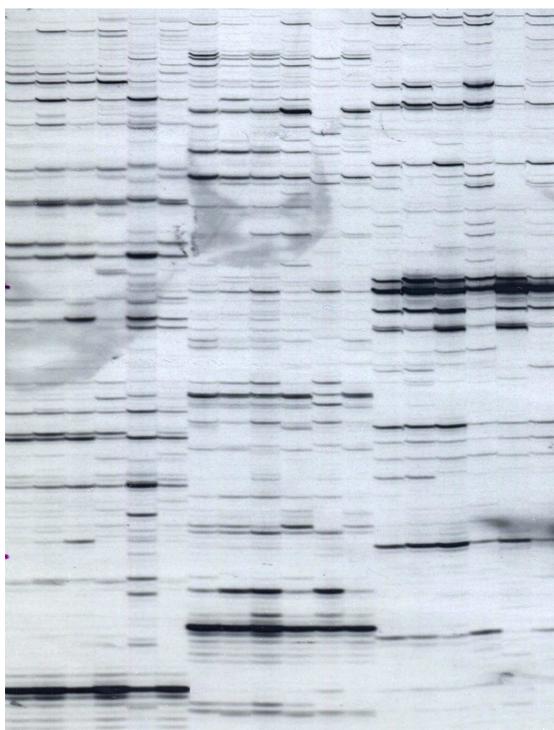
Amplificazione selettiva

Acqua	10,8 $\mu\text{l}$
Buffer Kit 10X	2,0 $\mu\text{l}$
PCR Nucleotide mix	0,5 $\mu\text{l}$
<i>PWO SY DNA Pol.</i> (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$
Primer <i>Bsty I</i> - $^{33}\text{P}$ *	0,5 $\mu\text{l}$
Primer <i>Mse I</i> (25 ng/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
<u>preamplificato diluito</u>	<u>5,0 <math>\mu\text{l}</math></u>
Totale	20 $\mu\text{l}$

I TDFs ottenuti sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide al 6% condotta in un apparato elettroforetico da sequenza S2S Sequencing System (OWL Technologies, U.S.A.) dotato di lastre di vetro 35x45 cm e spaziatori di 0.4mm . I gel sono stati fissati in acido acetico al 10% per 20 minuti e trasferiti su carta Whatman, seccati a 80°C per 20 minuti ed esposti a in cassette autoradiografiche a -80°C con pellicole Kodak X-Omat AR5 per il

tempo necessario dall'ispezione con un contatore Geiger della radioattività fissata al gel (normalmente 16-48 ore). Le pellicole sono poi state sviluppate e fissate in camera oscura, e i pesi molecolari delle bande sono stati assegnati per confronto con un marcatore 1Kb (Invitrogen) a sua volta marcato con  $^{33}\text{P}$  e caricato ogni 8 corsie sul gel.

Il gel è stato successivamente posto su una lavagna luminosa insieme alla lastra autoradiografica corrispondente, e i TDF sono stati excisi manualmente dal gel e si è poi proceduto al recupero del frammento di cDNA come descritto in seguito.



**Figura 2.10-** Esempio di corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide 6%.

#### **2.5.4 Eluizione delle bande**

Le bande di interesse, che dall'autoradiografia del gel cDNA-AFLP sono risultate indotte o represses in foglia o in radice, sia a  $0^{\circ}\text{C}$  sia a  $-2^{\circ}\text{C}$ , sono state excise da gel essiccato e reidratate in  $50\mu\text{l}$  di acqua sterile *RNase-free*.

Tutti i frammenti eluiti sono stati quindi amplificati utilizzando la combinazione dei primers selettivi che li aveva generati, e una DNA polimerasi “proofreading” ad alta affidabilità (50 volte in più rispetto alla normale Taq polimerasi; Invitrogen) in grado di generare blunt-end per la successiva fase di clonaggio.

Il protocollo è il seguente:

H <sub>2</sub> O	q.b.
Pfx50 Mix	2,50 µl
dNTPs (10 mM each)	0,75 µl
primer <i>BstY I</i> (10 µM)	0,75 µl
primer <i>Mse I</i> (10 µM)	0,75 µl
Taq polimerasi Pfx 50 (5U/µl)	0,5 µl
<u>Template (eluato t.q.)</u>	<u>5,0 µl</u>
Totale	25 µl

Programma PCR:

- 94 °C per 2'
- 1. 94 °C per 15''
- 2. 60 °C per 30''
- 3. 68 °C per 30''
- 4. Ripetere per 35 volte
- 5. 68 °C per 5'

La corsa elettroforetica su gel di agarosio 2% ha consentito di verificare la presenza della banda e il peso molecolare per ciascun TDFs amplificato.

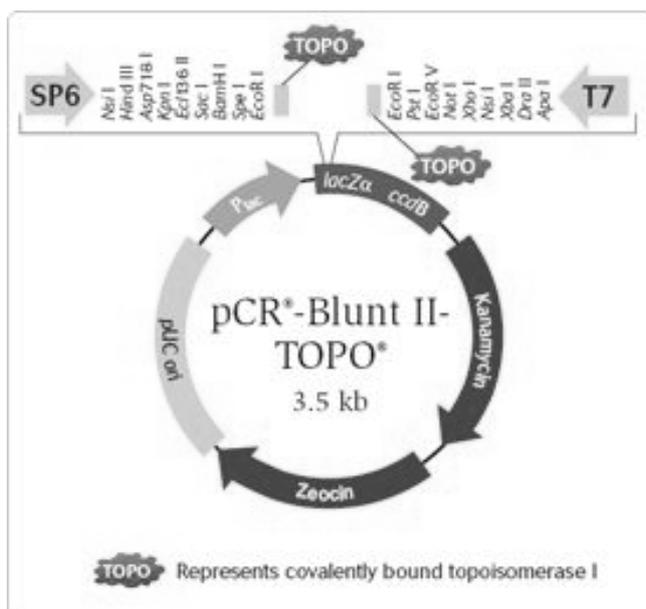
Dopo la riamplicazione di ciascun TDF e la verifica della sua identità sul gel di agarosio, le bande sono state poi excise, evitando di prelevare extrabande a volte presenti sul gel d'agarosio, tramite visualizzazione con transilluminatore ad UV, e purificate impiegando le colonnine del kit Pure Link Quick Gel Extraction kit (Invitrogen). La eluizione finale del campione è avvenuta in 50µl di acqua *DNase free*. Laddove le bande non presentavano extra-bande si è proceduto invece con la purificazione diretta dell'amplicone usando il Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen) ed eluizione finale in 50µl di acqua *DNase free*.

E' stata inizialmente scelta l'opzione del sequenziamento diretto, per verificare la possibilità di evitare la fase del clonaggio, ma la presenza di elettroferogrammi sovrapposti nella maggior parte dei casi indecifrabili, ha suggerito una putativa copresenza nella stessa banda sul gel di poliacrilammide di più sequenze aventi la stessa dimensione e quindi co-migranti nella corsa elettroforetica.

Dopo quantificazione di ogni singolo campione tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm, e anche su gel tramite confronto con quantità note di plasmide pUC19 linearizzato, si è proceduto con il clonaggio.

### 2.5.5 Clonaggio

Il clonaggio dei frammenti eluiti, riamplicati e purificati è stato effettuato utilizzando lo Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit (Invitrogen).



**Figura 2.11-** Mappa del vettore per Blunt II Topo (Invitrogen). I due rettangoli con la scritta “Topo” fanno riferimento al sito di collocazione dell’inserto. L’orientamento dei primers utilizzati per l’amplificazione dell’inserto e per il sequenziamento è evidenziato dalle due frecce in alto. Dopo che il DNA blunt si è legato al vettore, l’espressione del gene *ccdB* è distrutta e i cloni ricombinanti possono crescere, in caso contrario il gene letale *ccdB* viene espresso e le colonie non possono crescere. Inoltre la resistenza alla zeocina e alla kanamicina consentono la crescita in terreni contenenti questi antibiotici alle cellule di *E. coli* trasformate con tali cloni.

Le sequenze dei primers presenti sul vettore sono:  
M13 Reverse 5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′  
M13 Forward (-20) 5′-  
GTAAAACGACGGCCAG-3′

4 µl di amplicone purificato sono stati ligati al vettore PCR Blunt II Topo (Invitrogen; figura 2.11), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. 2µl di ligato sono stati clonati all’interno delle cellule competenti di *E. coli*, presenti nel kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) e conservate a -80°C. La trasformazione è avvenuta a seguito di shock termico (15 minuti in ghiaccio, seguito da 30’’ a 42°C). Dopo 1 ora di crescita in terreno liquido SOC, le cellule sono state piastrate su piastre Petri (diametro di 9cm), quindi messe ad incubare O/N a 37°C.

La crescita dei batteri viene effettuata in terreno LB addizionato di 1,5% di agar (agar-agar Merck, USA) e kanamicina 50 µg/ml. Le colonie singole, dopo essere state trasferite e numerate su una nuova piastra di terreno con una griglia sul fondo, sono state trasferite in tubini da 2 ml contenenti 850 µl di terreno LB liquido per la costituzione di stock in glicerolo e la conservazione a -80°C, e parallelamente in tubini da 1,5 ml in terreno LB liquido, e fatte crescere overnight a 37°C.

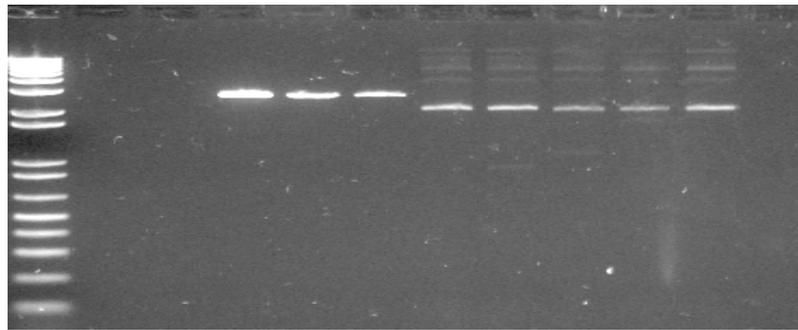
Per ogni frammento TDF originario isolato, sono stati conservati e sequenziati 3 cloni. Per ogni clone da sequenziare, sono stati prelevati 50µl di brodo di coltura, le cellule sono state centrifugate per 3 minuti a 12.000 rpm. Eliminato il surnatante, si è proceduto con l'estrazione del plasmide, utilizzando il kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) che prevede l'impiego di colonnine che legano selettivamente il DNA plasmidico permettendo l'eliminazione di tutte le altre componenti cellulari e dei contaminanti.

L'eluizione finale è stata effettuata in 75µl di acqua sterile.

### **2.5.6 Sequenziamento**

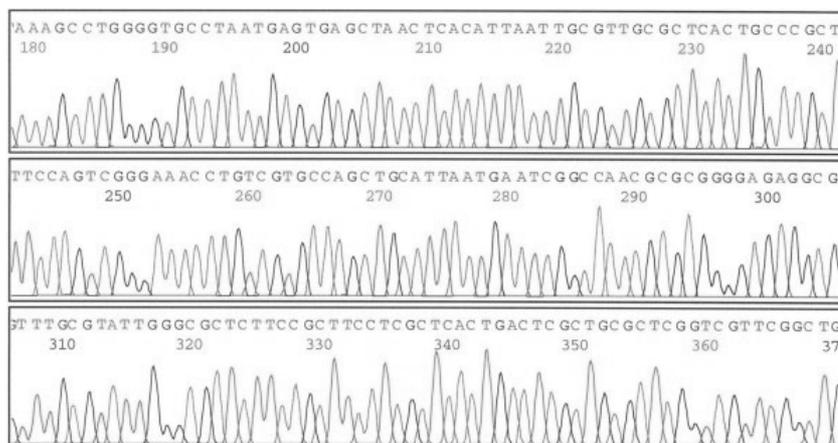
Sono state eseguite alcune prove preliminari al fine di ottimizzare la qualità delle sequenze. Inizialmente, abbiamo proceduto sequenziando, con il metodo Sanger, il prodotto PCR usando primer "interni" all'inserto (BstY o Mse). Le sequenze sono risultate di buona qualità ma la procedura è laboriosa in quanto prevede diversi *step* intermedi, quali l'amplificazione dell'inserto plasmidico e la purificazione del prodotto PCR, effettuata con ExoSap (USB Corporation, USA). Al contrario, sequenziando direttamente il plasmide estratto, si evitano i passaggi intermedi dell'amplificazione e della purificazione dell'amplicone, con conseguente risparmio di tempo e di costi. Il sequenziamento è stato quindi effettuato utilizzando il primer M13 FW (paragrafo 3.4.5), la cui sequenza è presente sul vettore ad una distanza di circa 100 pb dall'inserto. Il vantaggio è che le sequenze sono di qualità più elevata rispetto all'utilizzo per il sequenziamento del primer BstY, lo svantaggio è che tutte le sequenze devono poi essere "ripulite" dalla presenza delle sequenze contaminanti del vettore presenti sia a monte sia a valle dell'inserto. Le quantità richieste per il sequenziamento di ciascun campione sono di 400 ng di plasmide e 6,4 pmoli di primer.

Dopo aver quantificato su gel (vedi paragrafo 2.4.4; figura 2.12) tutti i plasmidi dopo l'estrazione da *E. coli*, 400 ng di plasmide sono stati essiccati in centrifuga sotto vuoto, risospesi in 10 µl di acqua sterile *DNA-free* e *RNA-free*, contenente 6,8 pmoli di primer M13FW; i 10 µl di ciascun campione sono stati quindi trasferiti su piastra da 96 pozzetti.



**Figura 2.12-** Quantificazione su gel dei plasmidi estratti. I primi tre campioni sono standard (pUC19 linearizzato), rispettivamente 250 ng, 125 ng e 50 ng.

Per la conservazione e il trasporto delle piastre, i campioni sono stati seccati a 65°C per 15 minuti in un termociclatore. Le reazioni di sequenza sono state condotte, presso la BMR Genomics (spin-off dell'Università degli Studi di Padova), in condizioni standard tramite il kit Big Dye terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) ed in maniera automatizzata grazie a un Tecan Genesis 150 Liquid Handling system. Le corse elettroforetiche sono state invece condotte su un Applied Biosystem ABI 3100.



**Figura 2.13-** Esempio di elettroferogramma ottenuto da ABI3100

### 2.5.7 Analisi delle sequenze TDFs

L'analisi degli elettroferogrammi, ha permesso di valutare la qualità delle sequenze ottenute. I file in formato *.ab1* sono stati visualizzati tramite il programma Chromas Lite versione 2.01, scaricabile dalla rete. Dalla valutazione della forma e dimensione dei picchi, della presenza di "N" (basi non identificate nella sequenza), dal rumore di fondo e dalla corrispondenza tra picco dell'elettroferogramma e *basecalling*, si è stabilito se la sequenza potesse o meno risultare accettabile. Per fare questo è stato utilizzato anche il software Codon Code Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>) che attribuisce un *quality score* ad ogni *base call*. Tutte le sequenze sono state convertite in formato FASTA e salvate in formato *.txt*.

Il set di 693 TDFs è stato analizzato tramite un *processing* tipicamente utilizzato per l'analisi bioinformatica delle ESTs, secondo le seguenti fasi:

- fase di *cleaning* delle TDFs, necessaria per individuare ed eliminare le sequenze contaminanti. Sono state quindi eliminate le sequenze appartenenti al vettore PCR Blunt II Topo (Invitrogen), sia precedenti che successive alla sequenza dell'inserito, tramite una ricerca delle sequenze del primer forward e del primer reverse, che rappresentano le sequenze "confine" del TDFs.
- fase di *clustering* delle TDFs, necessaria per raggruppare le sequenze ad elevata similarità e definire quindi dei cluster di appartenenza con lo scopo di individuare TDFs eventualmente appartenenti allo stesso trascritto. I confronti e gli allineamenti fra le sequenze sono stati eseguiti mediante T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/t-coffee/>).
- la caratterizzazione funzionale delle sequenze ottenute è stata quindi condotta per ricerca di similarità verso le sequenze in banca dati, utilizzando BLAST N (sequenza nucleotidica vs. sequenza nucleotidica) e BLAST X (sequenza nucleotidica vs. proteina), effettuando una scelta sulla base della percentuale di similarità, lo score, il *coverage* e dell'*E-value*. Le banche dati più utilizzate sono state BvGI (*Beta vulgaris* Gene Index-TIGR) e GenBank (NCBI). Quando una sequenza trova similarità con geni codificanti proteine putative espresse ma dalla funzione sconosciuta, è stata classificata come "*Funzione non identificata*" mentre se la sequenza non trova similarità significativa in banca dati viene classificata come "*Sconosciuta*";
- le sequenze che vengono identificate come simili a proteine a funzione nota, vengono invece raggruppate per appartenenza a processi biologici differenti, secondo le suddivisioni previste da Gene Ontology, ovvero un vocabolario controllato applicabile a qualsiasi specie e capace di attribuire ad ogni "termine" un codice riconoscibile da qualsiasi database.

In particolare i raggruppamenti che sono stati presi in considerazione sono:

1. appartenenza a processo biologico
2. funzione molecolare

La classificazione per processo biologico comprende in particolare 17 classi:

1. Metabolismo dell'RNA
2. Metabolismo nucleotidico
3. Metabolismo amminoacidico
4. Metabolismo dei carboidrati
5. Metabolismo secondario
6. Sintesi proteica

7. Modificazioni post-traduzionali
8. Processo dello sviluppo
9. Retrotrasposoni
10. Assimilazione dell'azoto
11. Fotosintesi
12. Glicolisi
13. Respirazione cellulare
14. Trasduzione del segnale
15. Trasporto
16. Risposta allo stress
17. Retrotrasposoni

## 2.6. ANALISI METABOLITI

### 2.6.1 Analisi del contenuto in carboidrati

Al fine di poter correlare i dati di espressione genica ai cambiamenti effettivi nel metabolismo dei carboidrati, abbiamo effettuato un'analisi dei profili dei metaboliti di interesse. L'effettiva concentrazione di singoli carboidrati in foglie e radici di controllo e trattate, è stata effettuata mediante analisi HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

La cromatografia liquida ad alta efficienza utilizza una pressione elevata per forzare il solvente attraverso colonne impaccate contenenti particelle molto fini che danno separazioni ad alta risoluzione.

Lo strumento utilizzato è l'Agilent 1100 series, abbinato ad una colonna specifica per la separazione dei saccaridi della tipologia Zorbax Carbohydrate (Agilent), con dimensioni: 4.6mm x 250mm 5 micron. Allo strumento abbiamo inoltre associato un detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector; Sedex 85) specifico per il rilevamento dei carboidrati.

I campioni, dopo essere stati pestellati in azoto liquido, sono stati estratti secondo il seguente protocollo:

1. Pesare 100 mg e risospendere in 4 ml di ETOH 80%
2. Porre sull'orbital shaker a 40°C per 16h a 50 rpm
3. Centrifugare 3000g per 10'
4. Trasferire 1,5 ml di surnatante in eppendorf da 2 ml
5. Portare a secco nella pompa a vuoto
6. Risospendere in 100 µl di H<sub>2</sub>O milliQ
7. Filtrare con filtri 0,2 µm

Le condizioni utilizzate per l'analisi HPLC-ELSD sono le seguenti:

- Fase mobile 75% e Acetonitrile, 25%, H<sub>2</sub>O
- Pressione colonna 85 bar
- Temperatura 25°C
- Flusso colonna 1.00 ml/min
- Volume di iniezione 20 microlitri
- Detector ELSD (Sedex 85)

## 2.6.2 Analisi del metaboloma

Un'analisi *not-targeted*, in grado di evidenziare intere classi di composti con analisi non distruttive, è stata invece condotta per l'ottenimento di dati da correlare all'espressione dei TDFs ottenuti mediante cDNA-AFLP.

I campioni sono stati analizzati tramite la spettroscopia High Resolution Magic Angle Spinning NMR (HR-MAS; Shintu L, Caldarelli S., 2005; Brescia *et al*, 2002). Questa tecnica consente di analizzare un campione in gel, in sospensione o allo stato colloidale. Lo spinning del campione all'angolo magico, permette di eliminare l'allargamento di banda dovuto ad interazioni dipolari e differenze di suscettività magnetica all'interno del campione ottenendo così spettri ad alta risoluzione. I campioni sono stati preparati inserendo *ca.* 5 mg di tessuto liofilizzato in un rotore HR-MAS da 4 mm con un volume di iniezione di 50  $\mu$ l insieme con *ca.* 45  $\mu$ L di tampone fosfato 0,01 M in D<sub>2</sub>O, a pH 7.2, e 0.5% TSP (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> acid sodium salt).

Gli spettri HR-MAS-NMR sono ottenuti a 298K (temperatura ambiente) con uno spettrometro Bruker AVANCE che opera ad una frequenza <sup>1</sup>H di 400.13 MHz, equipaggiato con un sonda HRMAS da 4 mm doppio canale e con uno spinning dei campioni a 7 kHz.

Gli spettri fanno riferimento al segnale dei gruppi metilici a  $\delta$ = 0.00 ppm di TSP.

Gli spettri <sup>1</sup>H-HRMAS-NMR sono stati ottenuti usando una sequenza con soppressione del segnale dell'acqua (noesypr1D della library Bruker), usando 32K di punti con ampiezza spettrale 4807 Hz e sommando 256 scansioni. E' stato usato un *recycle delay* di 2 secondi, un impulso a 90° di 5.0 microsecondi e la saturazione del segnale residuo dell'acqua è stata ottenuta irradiando a  $\delta$ =4.70 ppm durante il ciclo.

Ogni spettro è stato elaborato in trasformata di Fourier con 64 K punti, e la linea di base e la fase sono state aggiustate manualmente; un fattore di allargamento di banda di 0.3 Hz è stato applicato al FID ( Free Induction Decay) prima della trasformata di Fourier.

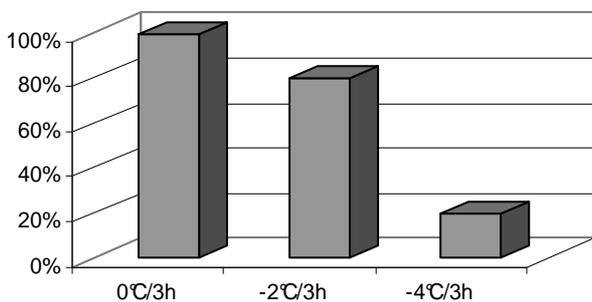
L'esperimento <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY è stato ottenuto con il metodo TPPI *phase-sensitive*, con un'ampiezza spettrale di 4807 Hz su entrambe le dimensioni, uno *spin-lock* di 4500 Hz da 100 msec., 2K punti in f2 e incrementi di 1K in f1, con 32 scansioni ognuno.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Valutazione del danno da basse temperature

Una varietà selezionata per semina autunnale ed una selezionata per i climi settentrionali dove tipicamente la semina avviene nel tardo inverno o inizio primavera, sono state valutate per la risposta alle basse temperature immediatamente dopo il trattamento a 0°C, a -2°C e a -4°C.

In entrambe le varietà, la percentuale di sopravvivenza, come atteso, decresce al diminuire della temperatura di trattamento (figura 3.1 a.), ed all'aumentare del tempo di esposizione alle basse temperature (dati non mostrati). In plantule di barbabietola da zucchero di 24 giorni, coltivate in idroponica, l'LT<sub>50</sub> è risultato pari a -3°C.



a.

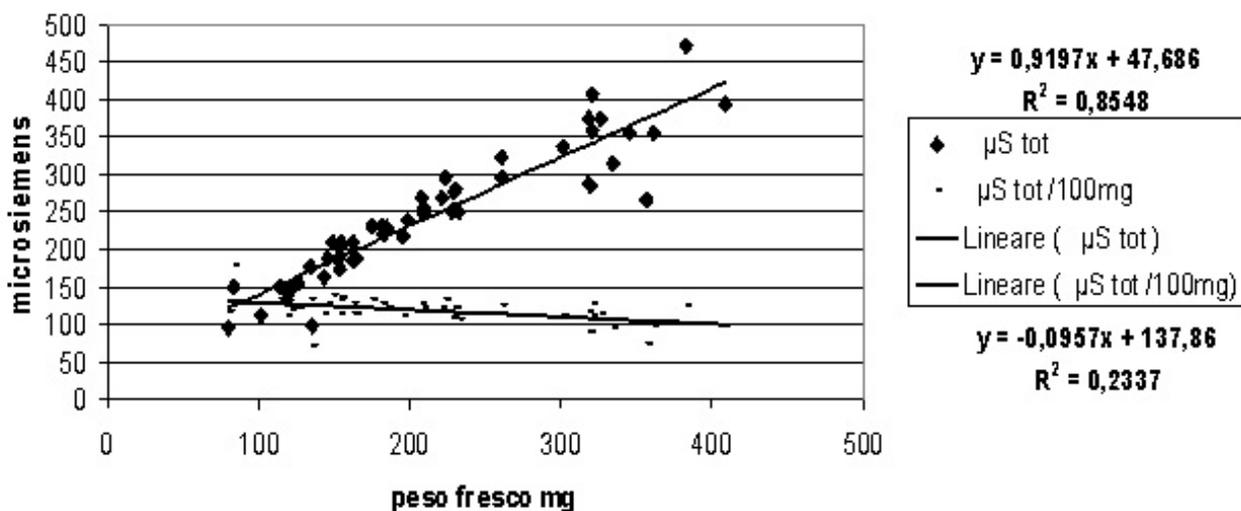


b.

**Figura 3.1 a e b-** Percentuale di sopravvivenza (a.) di plantule della cv. Bianca sottoposte a trattamento termico a -4°C (b.).

La valutazione del danno da basse temperature è avvenuta attraverso l'osservazione del rilascio degli elettroliti in tessuti excisi. Infatti, in risposta allo stress da basse temperature, le piante rilasciano elettroliti e, usualmente, in funzione di tale rilascio si quantifica il danno cellulare. Poiché tale test (Electrolyte Leakage test) presuppone una proporzionalità tra peso dell'organo analizzato e contenuto di elettroliti totali, misurato a seguito dell'estrazione totale dall'organo stesso, abbiamo correlato le due variabili come riportato in figura 3.2.

I dati di figura 3.2 sono pertanto serviti a verifica della affidabilità e costanza dell'estrazione degli elettroliti totali dal tessuto o organo analizzato, proporzionalità che è stata accertata, come dimostra il fatto che la pendenza della retta che correla peso fresco e contenuto di elettroliti è molto vicino ad 1,0 per un ampio range di pesi analizzati, e che la conduttanza per unità di peso risulta invece costante per lo stesso range di pesi.

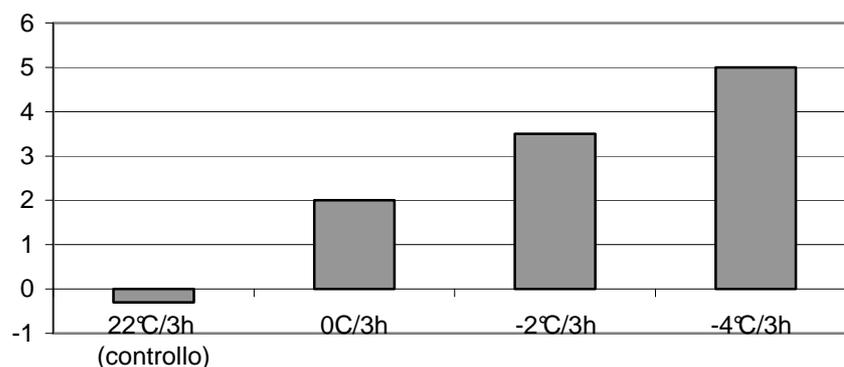


**Figura 3.2-** Rapporto tra peso fresco (in ordinate) e rilascio degli elettroliti totali in foglia (in ascisse).

Esponendo l'intero vasoio di plantule in idroponica alle basse temperature e calcolando il  $REL_T\%$  (Relative electrolyte leakage) e il  $I.I\%$  (Index of Injury), entrambi risultano pressoché costanti al variare dell'intensità dello stress (temperatura), e pertanto non utilizzabili per la valutazione del danno in piante in idroponica sottoposte a stress.

Misure periodiche della conducibilità ( $\mu\text{s}$ ) della soluzione prima e dopo il cambio del tampone, durante tutto il periodo dal momento della semina fino al prelievo, in tre vasche distinte, dimostra che la conduttanza della soluzione idroponica, rimane costante per tutto il periodo della crescita delle plantule in condizioni ottimali, mentre dopo il trattamento termico, calcolando il  $\Delta\mu\text{S}_{\text{trattato-controllo}}$  si osservano le differenze, riportate in figura 3.3. La spiegazione è da ricercare nel fatto che in idroponica già durante lo stress le piante rilasciano elettroliti nella soluzione di crescita (Hoagland) in quantità variabile, e che pertanto la perdita, soprattutto per il tessuto radicale, non sia quantificabile.

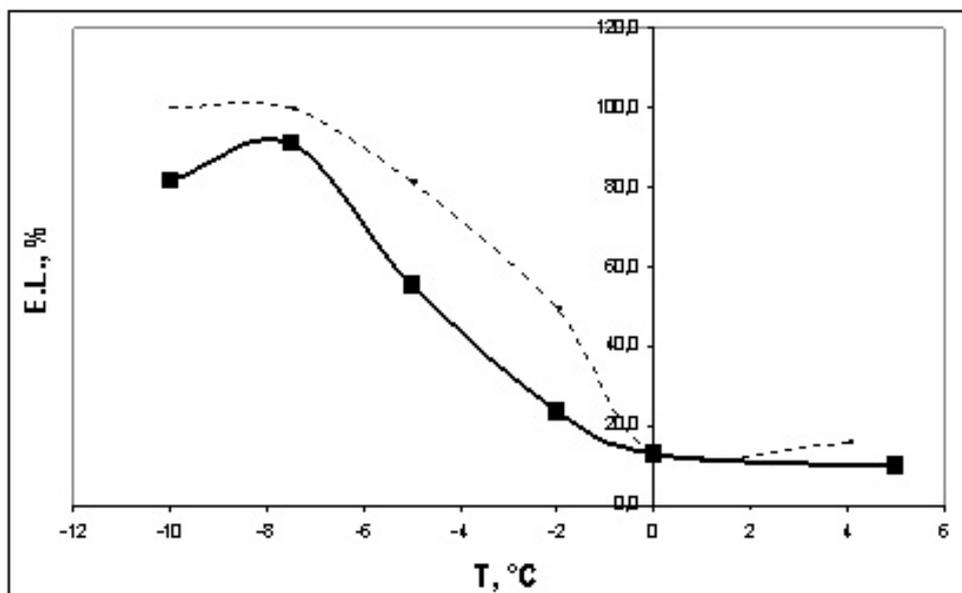
Di conseguenza, il test del rilascio di elettroliti condotto in soluzione idroponica è stato sostituito con un test su piantine in vaso della stessa età di quelle allevate in idroponica, delle due varietà in esame, allo scopo di accertare eventuali differenze di sensibilità dei tessuti excisi e poi esposti alle basse temperature, e di verificare il range di temperature entro le quali avvenisse l'induzione progressiva del danno cellulare.



**Figura 3.3-** Andamento della conducibilità della soluzione Hoagland al variare della temperatura di trattamento. Sull'asse x, la figura riporta l'esperimento controllo e i tre trattamenti effettuati, e sull'asse y, il  $\Delta\mu S_{(trattato-controllo)}$  che cresce al diminuire della temperatura di trattamento.

Il test E.L. ha consentito di evidenziare un aumento del rilascio di elettroliti in tessuti sottoposti a temperature decrescenti. Il danno all'integrità cellulare di tessuti sottoposti a basse temperature ha evidenziato un diverso comportamento, su organi prelevati a 24 DAP (Days After Planting) delle due cultivar nelle nostre condizioni sperimentali. I risultati, riportati in figura 3.4., suggeriscono che, per entrambe le cv., alla temperatura di 0°C ci sia un iniziale danno cellulare che cresce al diminuire della temperatura fino a -8°C. I tessuti della cv. Franca, in particolare, hanno un comportamento superiore a quelli della cv. Bianca, mostrando un minore danno cellulare alle temperature fra -2°C e -4°C, mentre fino a 0°C il danno è simile, e limitato per entrambe le cvs.

Poiché a -4°C la percentuale di mortalità delle piantine risulta comunque essere molto alta, si è scelto di impostare un sistema sperimentale che consideri solo l'esposizione delle piantine in idroponica a 0°C e a -2°C; in particolare l'RNA è stato isolato dalle plantule stressate ma sopravvissute al trattamento. La resa e la qualità dell'RNA risulta, inoltre, molto simile indipendentemente dall'organo prelevato e dalla temperatura del trattamento.



**Figura 3.4-** Andamento della percentuale di rilascio degli elettroliti, in ordinate, al decrescere della temperatura, in ascisse, nella cv. Bianca (linea tratteggiata) e Franca (linea continua).

### 3.2 Analisi della modulazione dell'espressione di geni di interesse a seguito del trattamento con basse temperature

In questa tesi, l'identificazione di nuove sequenze coinvolte in meccanismi di risposta agli stress abiotici è stata realizzata attraverso approcci differenti. Inizialmente, si è partiti da una ricerca relativa a funzioni geniche specifiche, impiegando informazioni molecolari note in altre specie, mentre, successivamente è stata condotta un'indagine genetica ad ampio spettro. Da subito, è risultata evidente l'importanza della ricerca in database pubblici di ESTs e dei software per la loro analisi, strumenti necessari per elaborare informazioni da sequenze parziali, ottenendo affidabili e accurate predizioni funzionali basate sulla similarità di sequenza, soprattutto qualora non siano disponibili estesi e annotati dati di sequenze genomiche.

#### 3.2.1 Validazione dei *Tentative Consensus* e dei saggi real-time PCR

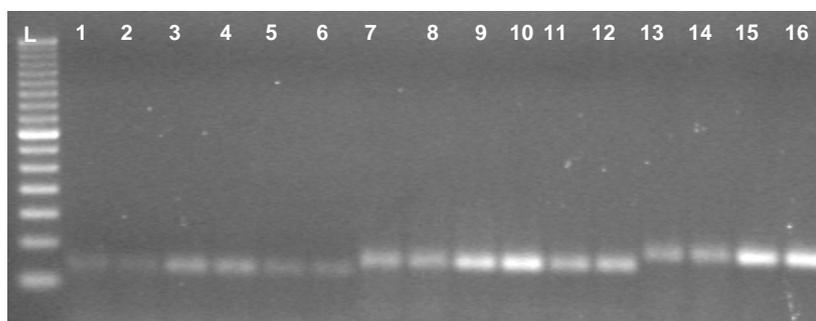
Per le piante la cui intera sequenza genomica è nota, la ricerca di funzioni geniche di interesse avviene attraverso l'utilizzo di appositi software che elaborano l'informazione nucleotidica alla ricerca delle sequenze di interesse. Al contrario, l'approccio d'elezione, quando non si hanno informazioni derivate da programmi di sequenziamento del genoma o del trascrittoma, è l'integrazione di studi *in silico* di ESTs (Expressed Sequence Tags), sequenze parziali di inserti di cloni a cDNA, a cui viene putativamente attribuita un'annotazione funzionale tramite il confronto con sequenze conosciute in altre specie, e analisi *in lab*. Questo approccio è stato usato con successo, ad esempio, in specie con grandi genomi non ancora sequenziati, come il pino (Whetten *et*

*al.*, 2001) e in specie di interesse industriale ma con ancora pochi dati di sequenza disponibili, come la bietola (Bellin *et al.*, 2002).

Al fine di analizzare i geni che contribuiscono al metabolismo di cocomposti correlati al saccarosio in *Beta vulgaris*, abbiamo disegnato 19 saggi per analisi real-time PCR (Assay by Demand, AbD) su altrettante sequenze omologhe del tipo TCs (Tentative Consensus) o ETs (Expressed Transcripts). Tra queste, abbiamo selezionato sequenze codificanti putativi *housekeeping* al fine di condurre la “Reference Gene Selection” (R.G.S.), e sequenze putativamente legate al carattere di interesse CSY (Corrected Sucrose Yield), quindi coinvolte nel ciclo di Calvin, nel metabolismo dei carboidrati, in particolare nella sintesi e degradazione del saccarosio, nella glicolisi e nell’osmoprotezione. L’unica eccezione è rappresentata dalla poliubiquitina 10, per la quale è stata utilizzata una sequenza eterologa di *A. thaliana* (AY056295).

Tutte le sequenze analizzate sono risultate espresse in tutti gli organi e condizioni considerate. Inoltre, l’elevata similarità tra le sequenze utilizzate (>80%) e le sequenze di geni ortologhi di *A. thaliana* e *S. oleracea*, è coerente con la vicinanza filogenetica a *Beta vulgaris*. Altri lavori finalizzati allo studio del carattere CSY hanno analizzato alcune delle funzioni geniche da noi studiate, ad esempio, allo scopo di valutare i polimorfismi tra materiale coltivato e selvatico (Schneider *et al.*, 1999). Studi analoghi che impiegano ESTs, e non sequenze genomiche, come template per il disegno di primers ne dimostrano l’affidabilità soprattutto nel caso di sequenze omologhe. Schneider *et al.* (1999) riporta, infatti, che ESTs eterologhe, possono avere una ridotta percentuale di successo (circa il 50%).

In questa tesi, l’impiego di TCs omologhi, invece che di *singleton*, assicura la massima specificità e attendibilità dei saggi utilizzati nello studio della modulazione dell’espressione di alcune funzioni geniche in diverse varietà commerciali in condizioni di basse temperature, ed i risultati ottenuti dimostrano l’importanza del potenziale delle banche dati ESTs.



**Figura 3.5** -Esempio di ampliconi ottenuti tramite real-time PCR dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 4%. I campioni 1-6 corrispondono ad amplificazioni di GAPDH in foglia (1-2), radice (3-4), cotiledoni (5-6); 7-12 corrispondono a tubulina in foglia (7-8), radice (9-10), cotiledoni (11-12). 13-16 corrispondono a bande corrispondenti ad actina in foglia (13-14) e radice (15-16).

I saggi real-time (primers/sonda) sono riportati in tabella 3.2 e sono stati impiegati per le amplificazioni di cDNA preparato da foglia, radice e cotiledone nelle condizioni riportate precedentemente. Alla visualizzazione su gel di agarosio, abbiamo identificato un solo prodotto di amplificazione, per tutti i saggi utilizzati, delle dimensioni previste rispetto alla previsione effettuata *in silico* (figura 3.5). Le efficienze delle real-time PCR e la variabilità *inter- e intra- assay* sono state valutate per tutti i saggi real-time PCR. Per rendere confrontabili i livelli di trascrizione dell'RNA in funzione dei Ct (Cycle Threshold) relativi, è necessario verificare che i saggi siano tra loro comparabili, come riportato da Pfaffl (2001). Il Ct è definito come il numero di cicli necessari perchè il segnale di fluorescenza raggiunga un valore predefinito per il rilevamento (*threshold*), ed è inversamente proporzionale alla quantità di templatato presente nella reazione. Le variazioni *intra-assay* osservate sono risultate trascurabili, inferiori al  $\pm 0,10$ , come raccomandato da Yuan *et al* (2006). Tutte le curve standard, individuate misurando 5 diluizioni seriali 1:10 in triplicato associate a ciascun saggio, mostrano una relazione lineare tra i valori di Ct registrati e il logaritmo del quantità del cDNA stampo, con  $r^2 > 0.97$ . Le efficienze risultano essere tutte tra l'86% e il 100%, con una variazione *inter-assay* (calcolata come CV%) sempre inferiore al 5%, evidenziando quindi un'alta precisione e riproducibilità dell'analisi. Ne consegue che tutti i saggi real-time PCR risultano accurati e affidabili nei tessuti e nelle condizioni da noi considerate. Le efficienze di amplificazione, i coefficienti di regressione lineare e la deviazione standard associata all'analisi *inter-assay*, calcolate su due corse real-time PCR indipendenti, sono riportati nella tabella 3.1.

Per verificare che non ci fossero amplificazioni aspecifiche, abbiamo sempre effettuato anche il controllo negativo (*RT minus*) che per tutti i saggi è risultato negativo, a testimonianza del fatto che anche se fossero presenti delle contaminazioni di RNA questo non risulterebbe amplificabile.

Intrassay					Interassay			
GENE	threshold	SLOPE	R <sup>2</sup>	E%	SLOPE	R <sup>2</sup>	E%	D.S.
GAPDH	0.2	-3.44	0.993	97	-3.50	0.992	93	2.8
TUB	0.2	-3.42	0.998	96	-3.40	0.999	97	0.6
ACT	0.2	-3.50	0.994	93	-3.41	0.992	96	2.4
RNA18S	0.2	-3.52	0.999	92	-3.53	0.999	92	0.3
RNA5S	0.2	-3.49	0.999	93	-3.41	0.999	96	2.1
GAPDH	0.2	-3.56	0.998	91	-3.42	0.996	96	3.6
TUB	0.2	-3.61	0.996	89	-3.50	0.997	93	2.7
ACT	0.2	-3.60	0.997	90	-3.52	0.998	92	2.0
RNA18S	0.2	-3.37	0.999	98	-3.44	0.992	95	1.9
RNA5S	0.2	-3.69	0.997	87	-3.54	0.999	92	3.5

**Tabella 3.1** - Esempio di calcolo dell'efficienza di amplificazione, del coefficiente di regressione lineare  $r^2$  e di valutazione della variabilità *intra- e inter- assay*.

Gene	Dimensione	Primer/sonda	Sequenza
$\beta$ TUB6	77	Foward	GACATTTGCTTCAGGACTCTCAAG
		Reverse	ACCATTTGATCTCTGCTACCATGAG
		Sonda	CCTAGCTTCGGTGATCTG
ACT11	90	Foward	CCGTTCTTTCTCTGTACGCTAGTG
		Reverse	TAGTCACACTGTTCCAATTTACGAGG
		Sonda	ACGTACCACAGGTATTGTG
GAPDH/NAD	65	Foward	GAAGCCCGTCTCCGTCTT
		Reverse	ATGGAGTCAGACTGGTGCTG
		Sonda	GCAGGAACCCAGAGGA
EF1 $\alpha$	81	Foward	CCCTTGGTGTCAAGCAAATGATTT
		Reverse	TACTCCAAGGCTAGGTACGAGG
		Sonda	ACAAGATGGATGCCACCACC
UBQ	62	Foward	GCGTGGAGGTATGCAGATCTTC
		Reverse	CCACCTCCAAAGTGATGGTCTT
		Sonda	CCGGTGAGAGTCTTCA
5S	70	Foward	CACCGGATCCCATCAGAACTC
		Reverse	GTAGTACTAGGATGGGTGACCTCC
		Sonda	CGTGCTTGGGCGAGA
18S	84	Foward	CGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTT
		Reverse	AACTTAAAGGAATTGACGGAAGGG
		Sonda	GAGTATGGTCGCAAGG
CMO	60	Foward	CAGCAAAGCAACTGAAACACAAAAT
		Reverse	GCCCCATTCTGCAACTTTTAGG
		Sonda	CCCAAGTTCTTTAGGATCCA
DREB2A	60	Foward	CGCACTATGTATGGTCCAAGTGATA
		Reverse	AGCGGAGTTATCTACAGAATCATCCT
		Sonda	CCCTTCGGATCACCC
SBSS1	62	Foward	GCTCGGCTTGCTGACA
		Reverse	CCAGAGACCGCACTTGGT
		Sonda	ACTATCTGCCACCAG
SBSS2	64	Foward	ACACACCCTACTCTGAGTTTCGAT
		Reverse	TCACCCCAACCTCTCCAAA
		Sonda	CCAATCTCCTGAAACTTGT
SPS1	68	Foward	GAGAACATGTGTTGGAGAATTTGG
		Reverse	TCTTCCGCTGAGCTTCTTCATT
		Sonda	CTCAAGCTGCTTCTTCTG
SPS2	70	Foward	AGAATATGGAATTTGGCAGCAGAAA
		Reverse	AGCCGAACGCTGAGCTT
		Sonda	CTCTCCCTCAATCTGTTTCT
FbPase	81	Foward	GCTGCTGGTTATTGCATGTATGG
		Reverse	ACCATTGACACCGCTTCCA
		Sonda	CTCTTGCACGCTTGTTCATG
FPald	60	Foward	AACTCTGAGGCTACTCTTGGTAAGT
		Reverse	GAAGGCTCTCAGAGGCATCAG
		Sonda	CTGCAGCACCACTTG
PDH kinase	76	Foward	CCAATTGATCGTAATTTGTTGATTTCTGCT
		Reverse	GTGACAAACCATAAGGAAGACTCTCA
		Sonda	CTTCCATTTCGAATTGC
RBCs1	60	Foward	CCTTCTAGTCAAGGGATGGATTCCCT
		Reverse	CCATCATAGTATCCTGGCGATTTGT
		Sonda	CACAAATCCGTCTTTGACTTC
GLCOX	56	Foward	AAAAGGCCGGCTTTAAGGCTATA
		Reverse	CAGCTTCTCTACGTCCCAATCG
		Sonda	CCCTTACTGTTGACTCTCC
GLU	65	Foward	AGAATGAGATGGGTTTCAGAAAACCTATATGG
		Reverse	GCACTCTGGTGGAAAAGCTTGA
		Sonda	ATTGGAAGCGATTTTC

**Tabella 3.2-** Saggi Abd: dimensione dell'amplicone e sequenza dei primer e della sonda. Il primer FW è in direzione 5'  $\rightarrow$  3', mentre il primer RW e la sonda sono in direzione 3'  $\rightarrow$  5'.

### 3.2.2 “Reference gene selection”

La stabilità di espressione di 7 geni putativi housekeeping (beta 6-tubulina, actina 11, gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, elongation factor-1 $\alpha$ , poliubiquitina 10, 5S RNA e 18S RNA) è stata valutata al fine di selezionare i geni di riferimento (“reference”) più adatti per la normalizzazione della quantitativa relativa.

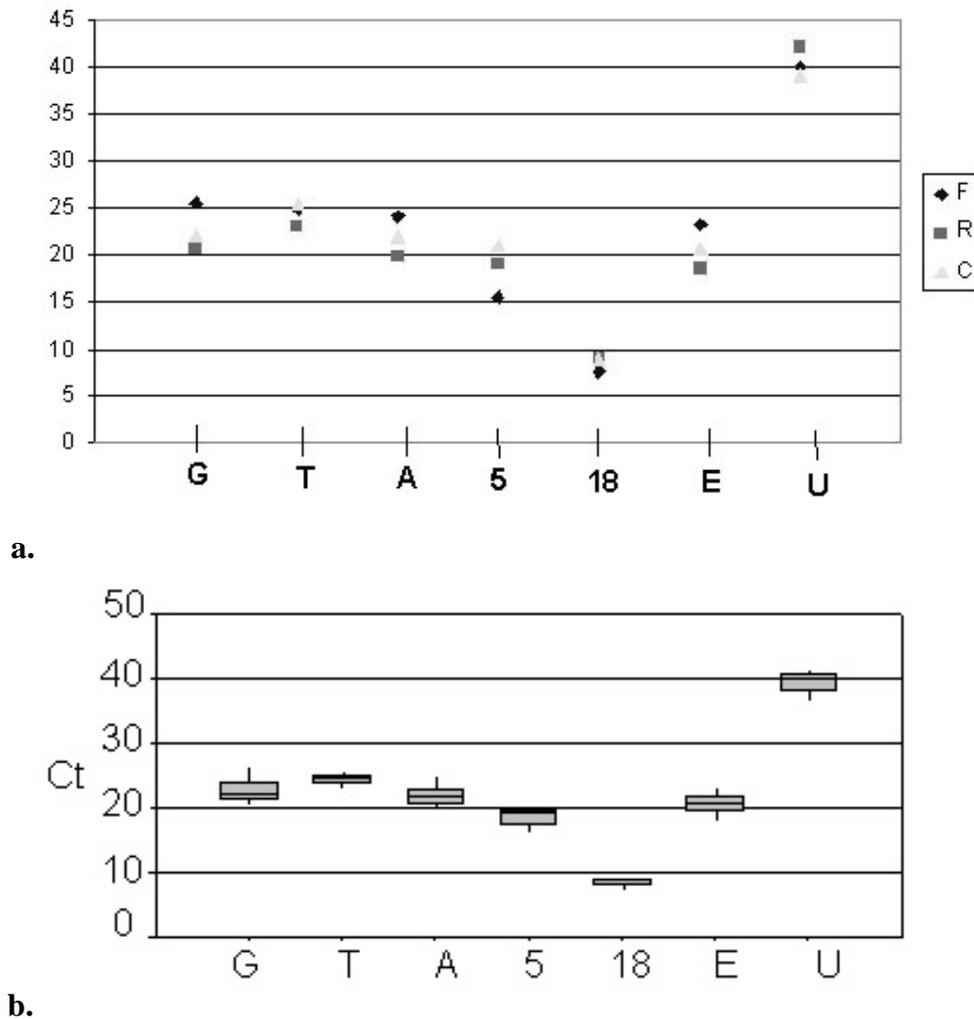
Le sequenze sono state selezionate in seguito ad una ricerca in banca dati TIGR-BVGI e Genebank, secondo quanto riportato nel paragrafo 2.4.1, e la misura della loro stabilità è stata effettuata tramite confronto diretto dei valori Ct, calcolo del range di Ct e misura dell’espressione relativa. Considerata l’accurata quantificazione dei campioni in pre-amplificazione, l’elevata riproducibilità dei dati ottenuti *inter-* e *intra-assay*, la media dei valori di Ct (mediana), dei percentili 25° e 75° ed i range di Ct, i risultati della quantitativa relativa possono essere attribuiti a reali e significative differenze nell’espressione dei trascritti. L’analisi dei Ct grezzi per poter essere affidabile ha richiesto una quantificazione precisa dello stampo, che deve essere a uguali concentrazioni in tutti i campioni messi a confronto.

Un’analisi preliminare della frequenza dei TCs nelle diverse librerie disponibili per *B. vulgaris*, secondo quanto raccomandato da Faccioli *et al.* (2007) e Coker *et al.* (2003), ha dimostrato che, per specie per le quali solo un numero limitato di ESTs e di librerie a cDNA è disponibile, come *Beta vulgaris*, questa strategia non risulta adatta.

#### 3.2.2.1 R.G.S in organi differenti in condizioni di controllo

Per valutare la stabilità dei livelli di trascritti dei 7 putativi geni di riferimento in foglia, cotiledone e radice di plantule sottoposte a normale regime termico di crescita ottimale, sono stati inizialmente misurati i Ct grezzi. I trascritti di tutti e 7 i geni sono risultati rilevabili in tutti e tre i tessuti ( $P > 0,05$ ).

La figura 3.6 mostra che i geni in analisi possono essere suddivisi in due gruppi: la maggior parte dei geni ha un livello di espressione simile ( $35 < Ct < 9$ ), con l’eccezione di un’espressione molto alta del gene 18S ( $Ct_{\text{medio}} < 9$ ) e di un’espressione piuttosto bassa per l’ubiquitina ( $Ct_{\text{medio}} > 35$ ). GAPDH, tubulina, actina e EF 1 $\alpha$ , indipendentemente dal tessuto considerato, hanno un livello di espressione inferiore ( $Ct > 18$ ) a quello dei geni ribosomiali ( $Ct < 18$ ). Inoltre, confrontando i range di Ct dei 7 geni presi in considerazione, la minor variazione, espressa come CV%, si ha per il rRNA18S (1,5%) e per la tubulina (2,4%), e la maggiore per l’ubiquitina (5,3%). Allo stesso modo, il coefficiente di variazione dei livelli di espressione della tubulina risulta essere pari al 5%, inferiore al 13% del 5S, e all’8% per ubiquitina.

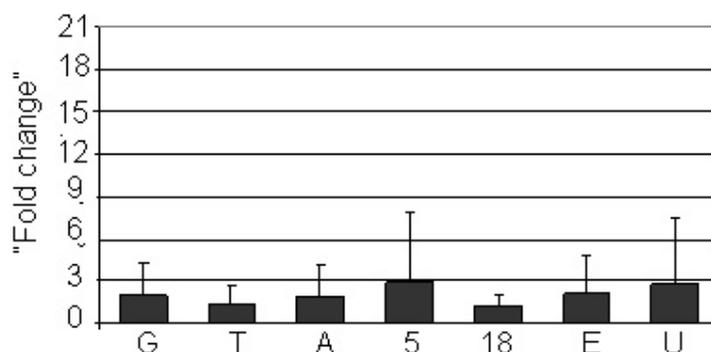


**Figura 3.6-**Valori di Ct, sull'asse delle ordinate, di putativi geni di riferimento in foglie (F, rombo), radici (R quadrato) e cotiledoni (C, triangolo) di plantule di barbabietola da zucchero non trattate (**a.**). Il grafico **b.** mostra per gli stessi geni le mediane (linee orizzontali), il 25<sup>TH</sup> e 75<sup>TH</sup> percentile (box), ed il range totale (barre verticali) dei Ct (Cycle threshold). Le lettere (G, T, A, 5, 18, E, U) sono abbreviazioni per: GAPDH, TUB, ACT, 5S, 18S, EF1 $\alpha$  e UBQ.

La figura 3.7 riporta i risultati ottenuti con il metodo del  $2^{-\Delta Ct}$ . Come atteso, l'espressione relativa dei 7 geni varia tra tessuti e la variazione di espressione media più alta si ha per l'rRNA 5S. Il  $2^{-\Delta Ct}$  medio per tutti i 7 geni candidati è sempre inferiore a 3, con un minimo per la tubulina (1,3) e per il rRNA18S (1,1) e un massimo pari a 8 per il rRNA 5S.

Ne consegue che i geni per l'rRNA18S e la tubulina sono quelli la cui espressione è risultata maggiormente stabile nell'analisi *inter-tissue* e quindi risultano come migliori geni di

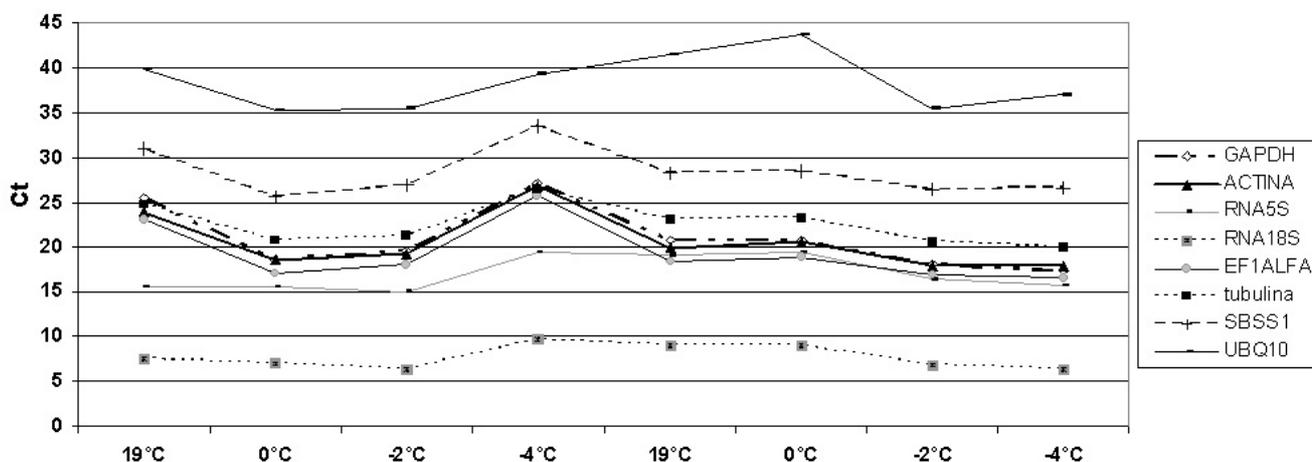
riferimento nella fase di normalizzazione necessaria nella quantificazione relativa dell'espressione di un gene target nel confronto fra organi di plantule non trattate.



**Figura 3.7**-Analisi *inter-tissue* dei migliori reference secondo il metodo del  $2^{-\Delta Ct}$ . Sono riportati i "fold change" medi (colonne) e massimi (barre). Le lettere (G, T, A, 5, 18, E, U) sono abbreviazioni per: GAPDH, TUB, ACT, 5S, 18S, EF1 $\alpha$  e UBQ.

### 3.2.2.2 R.G.S. in organi differenti sottoposti a trattamento termico

Gli stessi 7 putativi geni di riferimento sono stati analizzati in 8 condizioni al fine di individuare quelli la cui espressione risulti più stabile in foglia e radice di plantule trattate con le basse temperature. Poiché non è ragionevole pensare di individuare un gene che non subisca in alcun modo fluttuazioni di espressione, anche se minime, in risposta alle basse temperature, abbiamo scelto i geni la cui espressione risultasse solo minimamente regolata dalle basse temperature, in modo da garantire un'accurata normalizzazione del livello dei trascritti. I valori assoluti di Ct in tutte le condizioni e tessuti considerati sono riportati nella figura 3.8.

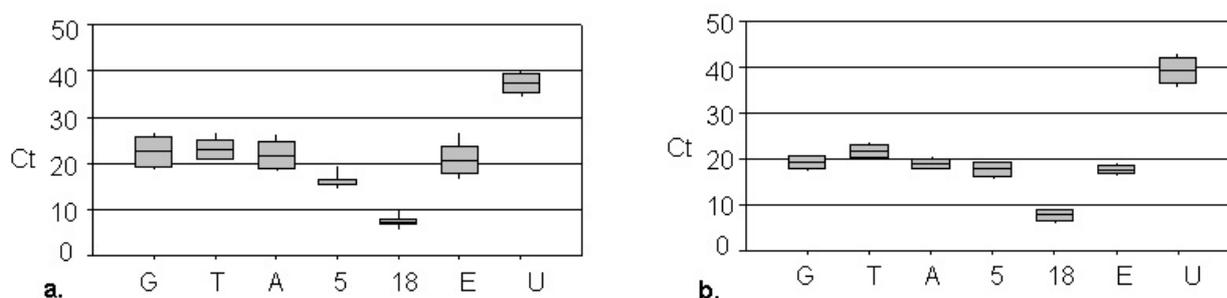


**Figura 3.8** - I valori assoluti di Ct relativi ai putativi geni di riferimento ed a un gene target (SBSS1) in tutte le condizioni e tessuti considerati. I dati riportati sono le medie delle tre repliche.

La figura 3.9 mostra invece la variabilità di espressione nelle condizioni termiche e nei tessuti considerati, valutata in termini di media dei valori di Ct (mediana), dei percentili 25<sup>TH</sup> e 75<sup>TH</sup> e di  $\Delta$ Ct medio (Ct controllo - Ct stressato) calcolato per ogni gene e per ogni condizione sperimentale, riportato in dettaglio in tabella 3.3.

Tessuto	T (°C)	$\Delta$ Ct GAPDH	$\Delta$ Ct Tubulina	$\Delta$ Ct Actina	$\Delta$ Ct RNA 18S	$\Delta$ Ct RNA 5S	$\Delta$ Ct EF	$\Delta$ Ct UBQ
Foglia	0°C	6.96	3.98	5.19	2.41	0.85	6.00	3.7
Foglia	-2°C	6.99	3.83	4.81	3.38	1.50	4.97	4.7
Foglia	-4°C	2.59	1.23	1.15	2.32	0.23	2.71	2.6
Radice	0°C	2.02	2.13	2.51	1.64	2.68	0.54	2.01
Radice	-2°C	0.32	0.29	0.43	1.14	0.57	1.59	0.9
Radice	-4°C	0.39	0.35	0.57	1.31	0.26	1.89	1.7

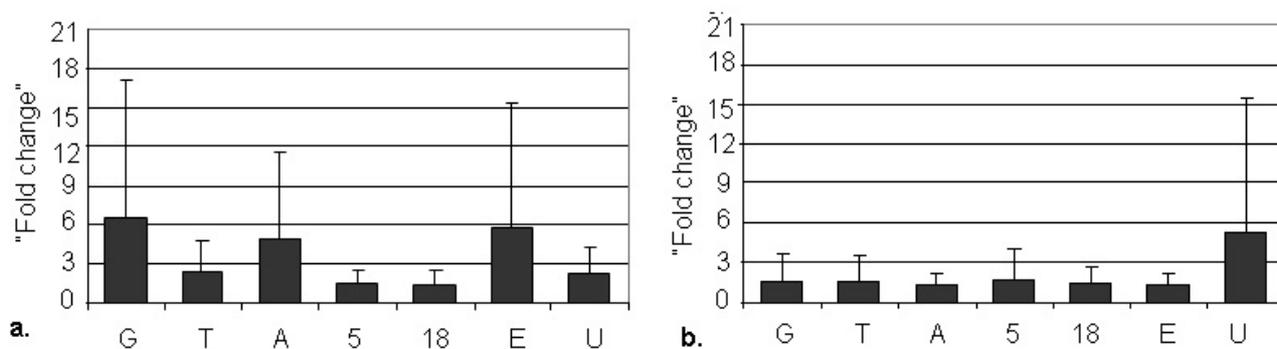
**Tabella 3.3-**  $\Delta$ Ct, espressi come valori assoluti, relativi ai 7 geni candidati come *housekeeping* nelle diverse condizioni sperimentali analizzate rispetto al controllo



**Figura 3.9-** Il livello di espressione dei geni candidati nelle foglie (a.) e nelle radici (b.) di plantule di barbabietola da zucchero trattate e non trattate con basse temperature. I dati mostrati riguardano le mediane (linee orizzontali) 25° e 75° percentili (box) e range totale (barre verticali) dei Ct (*Cycle threshold*). Le lettere (G, T, A, 5, 18, E, U) sono abbreviazioni per: GAPDH, TUB, ACT, rRNA 5S, rRNA18S, EF1 $\alpha$  e UBQ.

Il profilo di espressione relativa dei 7 geni candidati mostra un trend molto simile nei due organi (figura 3.9 a. e b.). I valori di espressione di GAPDH, TUB, ACT e EF1 $\alpha$  risultano simili, a differenza del livello di espressione dei due geni ribosomiali (più alto) e dell'ubiquitina (più basso), in tutti gli organi considerati. Le temperature di trattamento hanno influenzato in maniera differenziale la variazione di Ct misurata per i 7 geni nei due organi. L'intervallo di Ct e il CV sono risultati in generale più elevati nelle foglie, dove il minore corrisponde alla tubulina (CV= 11.9% e range= 5.7) e all' rRNA 5S (CV = 12.2% e range = 4.3) che risultano essere i due geni più stabili in foglie trattate, mentre l'EF1 $\alpha$  lo è nelle radici, mostrando il più basso range e CV (CV=6.7% e range=2.4).

Confrontando la figura 3.6 e 3.9 (a. e b.), è possibile notare che il pattern generale di espressione dei 7 geni è mantenuto in organi trattati e non trattati, suggerendo che sia i trascritti più abbondanti (rRNA 18S) sia quelli più rari (UBQ) mantengono la stessa abbondanza reciproca sia in organi tratti sia non trattati.



**Figura 3.10-** Analisi dei migliori reference in condizioni di stress termico in foglia (a.) e in radice (b.) secondo il metodo del  $2^{-\Delta Ct}$ . Sono riportati i “*fold change*” medi (colonne) e massimi (barre). Le lettere (G, T, A, 5, 18, E, U) sono abbreviazioni per: GAPDH, TUB, ACT, 5S, 18S, EF1α e UBQ.

I dati ottenuti con il calcolo del  $2^{-\Delta Ct}$  sono in accordo con quelli ottenuti con i metodi precedentemente descritti. Mentre nelle foglie, il “*fold change*” medio indotto dallo stress termico è risultato basso per i due geni ribosomiali, è risultato invece piuttosto alto per GAPDH e per EF1α (figura 3.10 a.).

Nelle radici, il “*fold change*” medio è risultato essere abbastanza costante e inferiore a 3 per tutti i geni, con la sola eccezione dell’ubiquitina, che mostrava un massimo “*fold change*” di 15 nel confronto tra temperature diverse di trattamento (figura 3.10 b). In generale, i livelli di espressione della maggior parte dei geni considerati sono risultati più stabili nelle radici che nelle foglie, a tutte le temperature considerate. Questo potrebbe, almeno in parte, essere spiegato con il fatto che mentre le foglie sono state sottoposte alla temperatura fissata nel refrigeratore (19°C, 0°C, -2°C o -4°C), con una differenza massima di 23°C tra un trattamento e l’altro, le radici hanno subito uno scostamento termico molto inferiore, in quanto la soluzione idroponica in cui erano immerse può oscillare al massimo tra +0,5°C e -0,5°C (19°C per le piante controllo), a seconda della temperatura imposta.

Complessivamente, i nostri risultati riportano, oltre all’RNA ribosomiale 18S, la tubulina come un ottimo *reference* in foglie di piante trattate alle basse temperature, come d’altra parte già riportato da Karetsou *et al* (2005) in relazione a piante di bietola trattate con alte temperature; in

radice, invece, EF1 $\alpha$  risulta il gene con l'espressione più stabile, come anche osservato per il tubero di patata da Nicot *et al* (2005).

In realtà, l'impiego di geni per l'rRNA come *reference* è piuttosto controverso. Infatti, se Thellin *et al.* (1999) ne raccomandano l'uso, in quanto risultano essere notevolmente stabili in molte condizioni e tessuti diversi, d'altra parte, presentano alcuni svantaggi. Infatti, non rappresentano adeguatamente, per esempio, l'integrità dell'mRNA, ed inoltre, poiché le subunità ribosomiali non sono poliadenilate, non possono essere usati quando si retrotrascrive il cDNA dall'RNA totale usando oligo-dT primers (Wong & Medrano, 2005). Inoltre, il rapporto tra mRNA e rRNA è variabile, in quanto la loro trascrizione avviene usando polimerasi differenti (Vandesompele *et al.*, 2002). In ogni caso, molti studi condotti su diverse specie ne fanno largamente uso (Thellin, *et al.*, 1999; Goidin *et al.* 2001, Burleigh, 2001; Gonzales *et al.*, 2002; Nicot *et al.*, 2005), ed i nostri risultati mostrano che l'esclusione di questi ultimi dalla fase di normalizzazione conduce ad una sottostima della variazione di espressione dei geni *target*. Perciò, la normalizzazione su RNA ribosomiali in associazione con un secondo *reference* risulta essere il metodo più accurato.

Poiché i criteri di selezione, oltre a tener conto della minore variabilità di espressione nei tessuti considerati, devono tener conto anche del fatto che il livello di espressione dei geni di riferimento dovrebbe essere il più simile possibile a quello dei geni *target* nei tessuti presi in considerazione, il gene per l'rRNA 18S da solo non sarebbe idoneo come gene di riferimento sia per l'analisi tra organi, sia nell'analisi delle foglie sottoposte a trattamento termico.

Anche se la maggior parte degli studi presenti in letteratura usano un unico gene di riferimento, Vandesompele *et al.* (2002), al fine di compensare eventuali fluttuazioni di espressione dei *reference*, raccomanda di usare sempre la media geometrica di almeno due geni risultanti come i più stabilmente espressi nella specie, organo, fase fisiologica e condizione sperimentale in analisi.

Infine, un appropriato gene di riferimento non dovrebbe essere influenzato dalle condizioni utilizzate. In questo lavoro, risulta evidente che un gene di riferimento universale non esiste, e che alcuni, tra i geni di riferimento più comunemente utilizzati, in realtà vengono influenzati dal trattamento con le basse temperature. Non tutti i geni più comunemente usati come *reference* possono essere impiegati indipendentemente dalla specie, tessuto e organo. Alcuni dei più utilizzati in letteratura (es. GAPDH e UBQ) sono risultati inadeguati nelle nostre analisi. L'ubiquitina, risultata il *reference* migliore in uno studio in *Beta vulgaris* in risposta ad uno stress biotico da infezione con nematode (Samuelian *et al.*, 2004), nel nostro sistema biologico non è risultato invece un buon *housekeeping*. Qualora si utilizzi un gene di riferimento non idoneo nella valutazione del rapporto controllo/trattato, i dati relativi ai *target genes* risulterebbero contraddittori.

Infatti, per esempio, nel nostro studio l'espressione della GAPDH è risultata fortemente influenzata dall'organo e dalle basse temperature. Nelle radici, GAPDH è risultata molto più

espressa che nelle foglie, e pertanto se fosse stata utilizzata per normalizzare i dati di espressione relativi alla localizzazione, ne sarebbero risultati dati di espressione forvianti e imprecisi. Un esempio, deriva dalla SBSS1 che sarebbe risultata maggiormente espressa in foglia piuttosto che in radice, come mostrato in figura 3.12, mentre il contrario è stato dimostrato sia in questa tesi sia in lavori precedenti (Hesse & Willmitzer, 1996).

E' pertanto consigliabile che la selezione di un appropriato controllo interno sia condotta per ogni nuovo sistema sperimentale.

### **3.2.3 Espressione organo-specifica dei geni oggetto di studio**

La localizzazione dell'espressione di trascritti in organi diversi di *Beta vulgaris* è stata precedentemente studiata da Kloos *et al.* (2002) e Hesse *et al.* (1995) e da un ampio studio, condotto tramite microarray, da Bellin *et al.* (2002).

Il profilo di espressione organo-specifico dei geni *target* oggetto di studio in questa tesi è stato valutato sia nell'apparato fogliare sia in quello radicale, considerando come *calibrator* foglia o radice in funzione della maggiore o minore espressione di ciascun gene in uno o nell'altro organo.

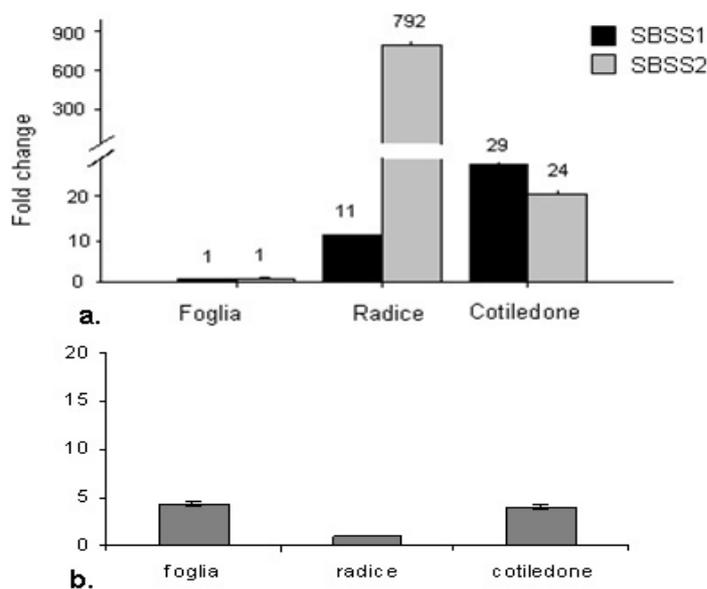
Il livello e la localizzazione dell'espressione sono stati misurati tramite real-time PCR e i dati, analizzati con il "comparative Ct method" ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), normalizzati sulla media geometrica dell'espressione della tubulina e del rRNA 18S. La maggior parte dei geni analizzati sono espressi in modo preferenziale in foglia o in radice ( $P < 0.001$ ). I livelli di espressione genica in relazione agli organi analizzati sono riassunti in figura 3.11.

Solo per la SBSS1 e SBSS2 è stato analizzato anche il livello dei trascritti nei cotiledoni di plantule della cv. Bianca come riportato in figura 3.12., e per entrambe risulta un maggiore accumulo nel cotiledone rispetto alla foglia.

Uno studio di Hesse *et al.* (1996) testimonia che l'espressione delle SBSS è predominante in radice piuttosto che in foglia in *B. vulgaris*. Il nostro lavoro, oltre che confermare questo dato, ha consentito di dimostrare che questa espressione differenziale è ancora più evidente per la SBSS2, che mostra un importante accumulo di trascritto nella radice sia della cv. Bianca sia della cv. Franca.

	B	B	F	F
	foglia	radice	foglia	radice
SBSS1	1	11	1	14
SBSS2	1	792	1	104
SPS1	1	54	1	4
SPS2	1	28	1	6
FBPase	7	1	1	22
FBPald	1	2	1	2
PDHkin	2	1	5	1
CMO	9	1	1	27
DREB2A	1	500	1	200
GLO	1	2	1	3
GLU	1	4	1	6
GAPDH	1	20	1	17

**Figura 3.11-** Andamento dei livelli di mRNA (espressi in *fold change*) misurati per ciascun gene di interesse in foglie e radici di piante di 24 giorni appartenenti alla cv. Bianca (B) e alla cv. Franca (F.).



**Figura 3.12-** Profilo di espressione relativa di SBSS1 e SBSS2 in radici e in cotiledoni rispetto alla foglia, utilizzata come calibrator. In **a.**, l'espressione è stata calcolata normalizzando i dati sulla media geometrica dei due geni costitutivi di riferimento, in accordo con l'assunzione derivata dalla RGS che questi siano costitutivamente espressi nei tre tessuti considerati. In **b.** la normalizzazione è invece avvenuta utilizzando come gene di riferimento GAPDH e usando come *calibrator* la radice.

Come mostrato in figura 3.11, i trascritti della fruttosio bifosfatasi e della colina monoossigenasi sono differenzialmente espressi in foglia o in radice, a seconda della cv. di appartenenza, mostrando un accumulo prevalente in radice nella cv. Franca, a differenza di quanto accade nella cv. Bianca. La fruttosio bifosfato aldolasi è differenzialmente espressa in maniera significativa in foglia e in radice, mentre il fattore di trascrizione DREB 2A ha un importante accumulo nella radice. La GAPDH mostra invece un'espressione preferenziale in radice dove il livello di trascritto è circa 20 volte maggiore che in foglia.

Questi risultati sono solo in parte in accordo con quanto riportato da Bellin *et al.* (2002), che identifica un'espressione preferenziale in radice per le saccarosio sintasi e per l'endoglucanasi, ma, ad esempio, riporta la GAPDH non differenzialmente espressa nei due tessuti.

### **3.2.4 Profili di espressione genica di geni oggetto di studio in seguito allo stress da basse temperature**

Esperimenti di *chilling* (6°C e 0°C) e di *freezing* (-2°C), hanno mostrato una variazione nel tempo dei livelli di trascritti dei geni analizzati tramite real-time PCR, con cambiamenti che possono individuarsi come precoci (dopo 3 o 5 ore), intermedi (24 ore) o tardivi (1 settimana).

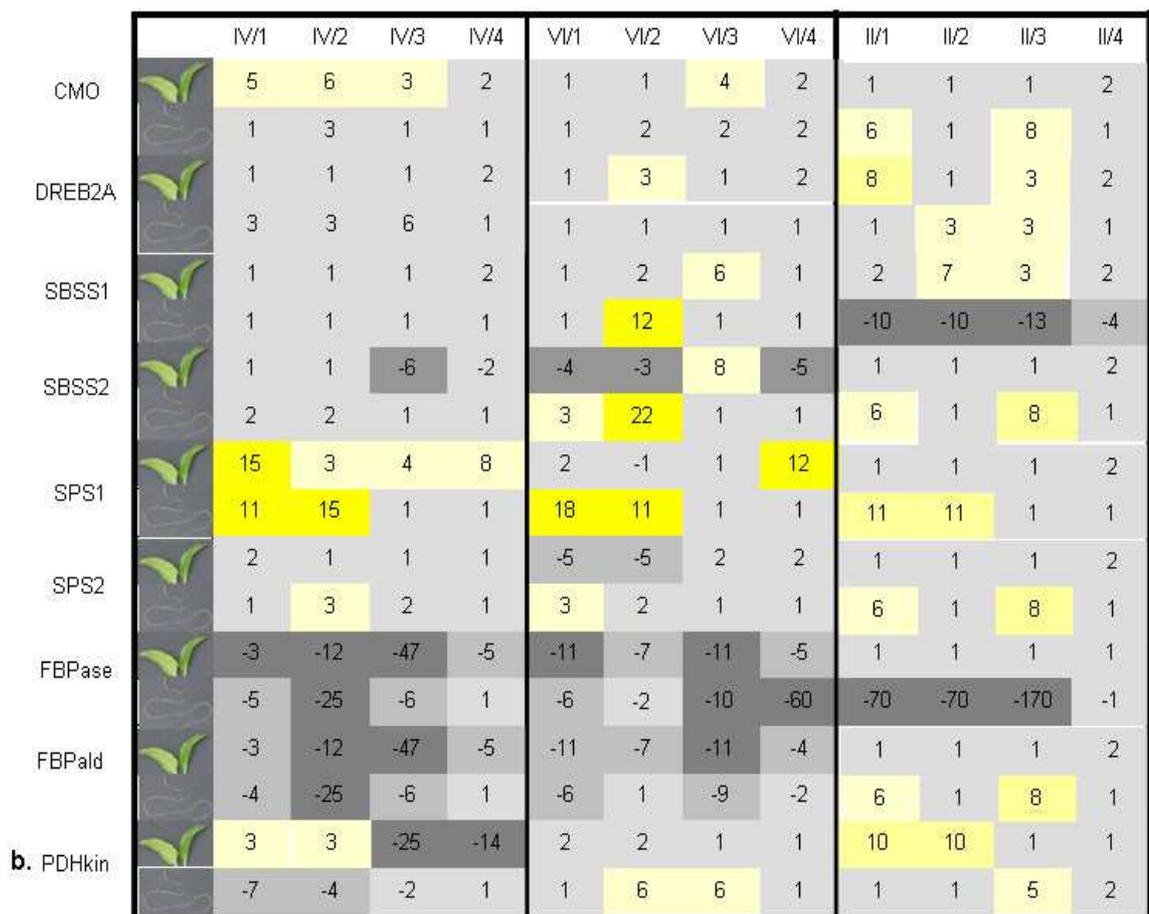
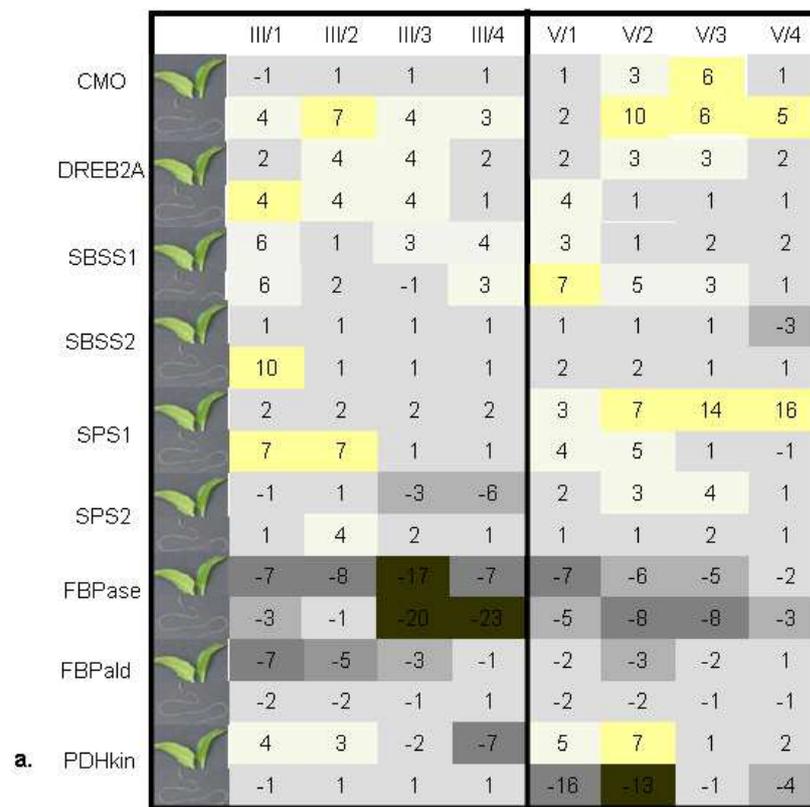
I livelli dell'espressione dei geni di interesse legati al carattere "qualità e resa in saccarosio" sono stati confrontati con quelli di geni che costituiscono noti marcatori della condizione di stress osmotico (CMO e DREB2A). L'induzione di entrambi i geni testimonia la risposta a livello trascrizionale degli organi di bietola al trattamento con basse temperature nel sistema sperimentale utilizzato.

La figura 3.13 a. e b. riassume il profilo di espressione di tutti i geni target in risposta alle basse temperature in foglia e radice della cv. Bianca. La figura 3.14 a. e b. riassume invece il profilo di espressione di tutti i geni *target* in risposta alle basse temperature in foglia e radice della cv. Franca. I numeri II, III, IV, V, VI indicano la tipologia di esperimenti, mentre 1, 2, 3, 4 rappresentano la successione dei prelievi, ovvero l'andamento nel tempo (da 2 ore a 1 settimana) dei livelli di mRNA misurati per ciascun gene di interesse in foglie e radici di piante di 24 giorni, secondo quanto riportato nella tabella 2.4. In figura 3.13 e 3.14, la quantificazione relativa dell'mRNA è descritta sia dal colore sia dal valore numerico.

	III/1	III/2	III/3	III/4	V/1	V/2	V/3	V/4
CMO	1	1	1	1	1	3	6	1
	4	7	3	3	1	21	16	182
DREB2A	2	5	4	2	2	3	3	2
	4	10	1	1	4	1	1	1
SBSS1	16	2	-2	2	6	4	2	1
	-2	2	2	-2	17	2	-4	2
SBSS2	1	1	1	2	1	3	2	1
	22	1	3	-6	22	1	1	1
SPS1	19	-1	2	-1	1	5	4	5
	-1	1	2	-2	1	1	1	17
SPS2	-2	1	3	-2	-1	5	8	2
	10	2	2	-1	1	1	1	8
FBPase	-2	1	6	1	2	4	8	1
	5	1	3	-1	1	2	3	6
FBPald	-2	-2	3	2	1	3	3	2
	12	1	1	2	1	1	2	2
PDHkin	-2	2	10	-2	2	4	4	2
	5	2	2	-2	2	1	1	3
GLCOX	4	5	6	1	1	2	5	-5
	11	1	5	1	1	2	1	5
Glu	1	-1	4	2	2	2	2	3
	1	1	1	1	2	1	1	1
a. rbcsl	-2	-2	3	-2	2	2	3	2

	IV/1	IV/2	IV/3	IV/4	VI/1	VI/2	VI/3	VI/4	II/1	II/2	II/3	II/4
CMO	5	2	1	3	5	5	3	3	2	2	2	1
	1	3	2	2	3	6	3	-1	6	6	8	7
DREB2A	2	1	5	5	8	6	-1	2	3	6	3	3
	5	5	6	6	10	3	1	1	6	5	2	1
SBSS1	-3	-2	-2	2	-5	-6	-4	-25	2	2	2	4
	2	2	2	1	2	1	1	1	3	-2	-4	-5
SBSS2	-2	1	4	-1	-2	-2	-3	-3	2	1	1	1
	2	2	1	1	2	3	1	3	3	1	4	1
SPS1	-4	1	-2	-1	-4	1	-2	-1	-4	1	-2	-1
	3	2	1	3	3	2	2	2	-1	1	1	1
SPS2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	3	1	2	1	3	2	-10	-5	-16	-12
FBPase	-2	1	2	-2	1	-1	1	-2	-1	1	1	1
	1	1	1	7	1	5	1	1	25	2	2	3
FBPald	2	8	5	5	1	2	2	2	1	-2	2	2
	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2
PDHkin	-3	1	1	-3	-12	-3	-5	-5	-1	-3	-1	-1
	1	3	3	3	1	2	1	3	2	2	4	-2
GLCOX	1	1	-2	3	1	2	9	5	2	2	2	1
	5	3	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1
glu	1	2	2	1	-2	1	2	-2	3	2	-2	1
	1	2	2	1	1	2	2	3	2	2	1	1
b. rbcsl	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1

Figura 3.13 a. e b. - Profili di espressione dei geni target analizzati nella cv. Bianca.



**Figura 3.14 a. e b.** - Profili di espressione dei geni target analizzati in cv. Franca.

## DREB2A

BQ592254

*A. thaliana* ; Score 109.00 E-value 4.00E-23

Appartiene alla famiglia DREB e alla sottofamiglia dei fattori di trascrizione ERF/AP2 e la cui struttura genetica è riportata in figura 3.15.. Codifica per un fattore di trascrizione che si lega all'elemento cis DRE-CRT, noto in *Arabidopsis* per essere coinvolto nella trasduzione del segnale in risposta allo stress da freddo e alla siccità.



**Figura 3.15**-Immagine dei dettagli della mappa genetica del locus AT5G05410 (www.arabidopsis.org)

E' l'unico tra i geni analizzati a non avere un TC corrispondente ma una singola EST. La scelta è ricaduta sul DREB2A i quanto è l'unica sequenza tra quelle note per essere coinvolte nella trasmissione del segnale in *Arabidopsis* a trovare un'elevata similarità in seguito ad una ricerca per similarità (BLAST N) nei database di ESTs di bietola. L'analisi real-time rivela che è sovra-espresso nelle radici di entrambe le varietà commerciali analizzate, in accordo con la sua appartenenza a librerie radice-specifiche e induzione precoce.

## CMO

AF023132

*B. vulgaris*, omologo

La colina mono-ossigenasi (CMO) è l'enzima chiave della biosintesi della glicin-betaina:



La glicin-betaina è un importante osmoprotettore che si accumula in molte specie tra cui *S. oleracea* e *B. vulgaris* in risposta a stress osmotico. Russel *et al.* (1998) hanno osservato, in *B. vulgaris*, che la CMO risponde con induzione fino a 5 volte in risposta allo stress idrico e fino a 10 volte in risposta a stress salino. Nel nostro sistema sperimentale, nella cv. Bianca, il gene CMO mostra un marcato e stabile aumento di trascrizione in fase tardiva nelle radici (ma non nelle foglie), in seguito a esposizione a -2°C (fino a 182 volte), suggerendo un'attivazione della via di accumulo della glicin-betaina al fine di mantenere il potenziale osmotico cellulare, come d'altra parte è stato osservato anche da Pestsova *et al* (2008).

## SBSS1; SBSS2

AF173253; AY451173 (TC18)

*B. vulgaris*, omologo

I due geni SBSS1 e SBSS2 (*sugar beet sucrose synthase 1 e 2*), codificanti due isoenzimi, entrambi con attività UDP-glucosio: D-fruttosio 2-glucosil-trasferasi (EC 2.4.1.13), sono implicati nella reazione reversibile di biosintesi/degradazione del saccarosio. Entrambe le sequenze sono state isolate in *B. vulgaris*. SBSS1 è stato isolato da Hesse e Willmitzer (1996) da una libreria a cDNA di radice, mentre SBSS2 da Haagensohn *et al.* (2006) da una libreria cDNA di germogli osmoticamente stressati. I due geni hanno il 62% di similarità nucleotidica e l'80% di similarità della putativa sequenza amminoacidica, ottenuta per predizione. La figura 3.16 mostra l'allineamento nucleotidico utilizzato per il disegno del saggio per l'amplificazione real-time PCR di SBSS1 e SBSS2.



**Figura 3.16**

Porzione di allineamento nucleotidico tra la sequenza espressa di SBSS1 (cds, *coding sequence*), SBSS2 e la sequenza genica di SBSS1 da cui è possibile ricavare la collocazione degli introni (sequenze in nero) e osservare le regioni evidenziate che corrispondono ai primer FW (in azzurro), alle sonde (in verde) e ai primer RW (in rosa), utilizzati nei due saggi corrispondenti.

Secondo Haagenson *et al.* (2006), un'analisi filogenetica delle sequenze amminoacidiche di SBSS1 e SBSS2, colloca la prima nel gruppo SUSA (SUcrose Synthase A, Komatsu *et al.*, 2002) e la seconda nel gruppo SUS1 (SUcrose Synthase 1), comune a molte dicotiledoni.

E' noto che la biosintesi del saccarosio avviene principalmente nelle foglie (*source*), a partire da un trioso fosfato, traslocato tramite il trasportatore di trioso fosfato dal cloroplasto, derivante dal carbonio fissato fotosinteticamente e rappresentante, nella maggior parte delle specie vegetali, il precursore biosintetico dell'amido. Successivamente viene traslocato nella radice dove si stabilisce un equilibrio fra degradazione e risintesi, ma soprattutto viene accumulato nelle cellule parenchimatiche (Elliott e Weston, 1993).

Dai nostri risultati appare evidente una risposta a livello di espressione genica già nelle prime fasi del metabolismo biosintetico del saccarosio; infatti il livello dei trascritti di SBSS1 e SBSS2, più abbondante nelle radici delle piante di controllo, si alza precocemente già dopo 3 ore di trattamento a basse temperature sia in foglia sia in radice (soprattutto nella cv. Bianca). Tale risposta è risultata però transiente quando si sono analizzati i livelli di espressione genica fino ad 1 settimana dopo l'applicazione dello stress. In seguito all'esposizione a basse temperature, entrambi i geni rispondono con un'*up*-regolazione rispetto al controllo in maniera via via decrescente all'aumentare dell'intensità dello stress in foglia, e crescente in radice ( $P < 0.001$ ). Durante lo stress il livello di espressione aumenta fino a 22 volte in radice e a 16 volte in foglia. Durante la fase di esposizione a 6°C, seguito da un ulteriore abbassamento delle temperature a -2°C, invece, SBSS1 viene represso, riflettendo una potenziale diversa attività solo durante questa fase. Nella radice, SBSS1 ed SBSS2 sono invece poco influenzati dall'acclimatamento a 6°C e, in particolare, SBSS2 non registra alcuna variazione significativa ( $P > 0.001$ ). Prima di questo lavoro, solo due studi hanno riguardato la modulazione dell'espressione genica delle SBSS. Hesse *et al.* (1996) non riportano alcuna modulazione significativa in risposta al trattamento a 4°C per 48 ore per la SBSS1, mentre Klotz *et al.* (2005) osservano un'induzione per la SBSS2 dopo tre giorni dal trattamento; gli stessi autori osservano inoltre che lo stress da ferita e l'anossia provocano su entrambi i geni delle immediate e intense modulazioni a livello di espressione genica. Inoltre, è stato anche osservato da Klotz *et al.* (2005) che a tale modulazione non corrisponde alcuna modifica nel contenuto del relativo enzima.

La necessità di un aumento dell'attività glicolitica, e quindi della produzione energetica, con conseguente accelerazione dell'attività degradativa del saccarosio ed interruzione della sua traslocazione nelle radici possono rappresentare il contesto fisiologico in cui inquadrare i risultati fino ad ora ottenuti.

## **SPS1; SPS2**

X81975; TC162

*B. vulgaris*, omologhi

Le due saccarosio fosfato sintasi catalizzano le fasi finali della sintesi del saccarosio e giocano un ruolo primario nell'accumulo di saccarosio nelle radici regolandone la forza come *sink* (Fieuw e Willenbrink, 1989). E' infatti accertato che, nella foglia, l'attività delle SP sintasi è prevalentemente biosintetica, al contrario di quella delle SBSS (Paulinova *et al*, 2002).

Nel nostro studio, l'analisi di espressione genica di SPS1 e SPS2 evidenzia una loro attivazione transiente soprattutto nelle radici sia a 0°C sia a -2°C, e solo per il gene SPS1 nelle foglie sottoposte a -2°C è stato osservato un aumento tardivo del trascritto in entrambe le cvs. in analisi, che persiste anche dopo una settimana dal trattamento, e una forte repressione di SPS2 nella radice durante la fase di acclimatamento in Bianca; in Franca, si nota inoltre una generale induzione della SPS1 e SPS2 quando i trattamenti termici sono preceduti da un acclimatamento a 6°C.

## **Piruvato deidrogenasi chinasi**

TC1415

*B. vulgaris*, omologo

Tramite fosforilazione/inibizione della piruvato deidrogenasi, viene regolata l'ossidazione del piruvato, e quindi l'intero ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Dai nostri risultati, durante il trattamento a 6°C, si osserva l'inibizione a livello fogliare dell'espressione del gene per la PDH kinasi, che presumibilmente garantisce l'attività della PDH nel catalizzare il flusso dei carboidrati verso il Ciclo di Krebs. Nella cv. Franca, dopo il trattamento a 6°C (esperimento II) si nota, al contrario, un livello del trascritto piuttosto alto in tutti i prelievi effettuati.

## **Fruttosio 1,6 bifosfatasi citosolica**

TC4084

*B. vulgaris*, omologo

Regola il più importante nodo metabolico nella sintesi/degradazione del saccarosio, controllando il mantenimento della forza del sink tramite la risintesi del glucosio partendo dal saccarosio (Nielsen *et al*, 2004). Pestsova *et al*. (2008) osserva che semi in germinazione sottoposti a diversi tipi di stress osmotico, non rispondono con alcuna modulazione significativa della F1,6BPase o della PFK (fosfofruttochinasi) che catalizza la reazione inversa. Una modulazione differenziale dell'espressione della FBPase è stata invece da noi osservata nelle due cvs. analizzate. Mentre non ci sono significativi cambiamenti nella cv. Bianca, ad eccezione di una transiente induzione dopo l'esposizione a 6°C, in radice durante l'acclimatamento, nella cv. Franca lo stress da

basse temperature provoca profonde e stabili alterazioni nell'espressione genica, soprattutto per la FBPasi (figura 3.17); questa regolazione differenziata dell'espressione genica relativa a due enzimi chiave nel metabolismo dei carboidrati in cv. selezionate per la crescita in condizioni di temperatura differenti non era stata ancora riportata, e suggerisce, integrata all'osservazione di un'induzione delle SBSS, prevalentemente coinvolta nella degradazione piuttosto che nella biosintesi del saccarosio, e dell'inibizione della piruvato deidrogenasi chinasi, una possibile ripartizione dei triosi fosfati a livello del citosol verso il metabolismo glicolitico che, attraverso la degradazione del glucosio porta ad un aumento della produzione energetica necessaria per la risposta allo stress e alla parallela mobilitazione delle riserve del saccarosio.

### **Fruttosio bifosfato aldolasi**

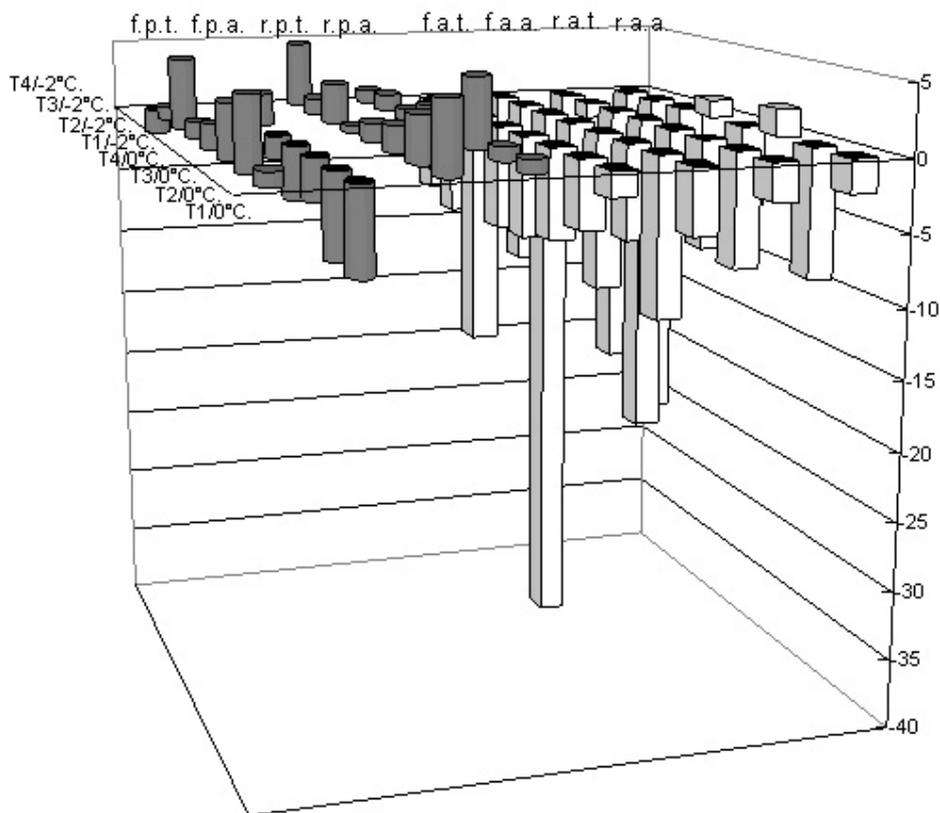
TC1384

*M. crystallinum*, Score 120.00 E-value 2,3E-28

Catalizza la reazione precedente rispetto a quella catalizzata dalla fruttosio 1,6 bifosfatasi, permettendo la conversione del diidrossiacetonfosfato e della gliceraldeide-3-fosfato in fruttosio 1,6 difosfato. Come per la FBPase, l'aldolasi, solo nella cv. Franca, subisce una netta *down*-regolazione durante il trattamento con le basse temperature, ed indipendentemente dalla temperatura utilizzata (6°C, 0°C o -2°C), che risulta essere costante nella maggior parte dei prelievi temporali effettuati.

L'esposizione lenta e graduale a temperature basse ma non lesive per la pianta, induce in molte specie il fenomeno denominato *hardening*, non osservato però in barbabietola da zucchero, anche se gli esperimenti condotti non possono essere indicativi in tal senso, registriamo un comportamento differenziale per le due cultivars dopo esposizione a 6°C, seguita da ulteriore abbassamento delle temperature fino ad un minimo di -2°C. Infatti evidenti e consistenti variazioni nell'espressione della maggior parte dei geni analizzati sono state osservate prevalentemente nella cv. Franca (figura 3.13 e figura 3.14).

I risultati di questo studio dimostrano che l'esposizione a basse temperature ha un importante impatto sul livello di molti trascritti legati al metabolismo del saccarosio, come riportato in diverse altre specie (Baud *et al.*, 2004). Klotz *et al.* (2007) hanno però osservato che cambiamenti nell'espressione di alcuni geni legati alla sintesi/degradazione del saccarosio non necessariamente si riflettono in cambiamenti nel contenuto della proteina corrispondente o nell'attività enzimatica, suggerendo una possibile regolazione post-trascrizionale.



**Figura 3.17-** Confronto dei risultati relativi all'espressione del gene per la FB Pase in tutti i campioni e cultivar analizzati. Il grafico riporta sull'asse y i rapporti di espressione analizzati e sull'asse x i trattamenti e i prelievi effettuati: T1 (prelievo dopo 3 ore di trattamento), T2 (prelievo dopo 5 ore di trattamento), T3 (prelievo dopo 24 ore dalla fine del trattamento), T4 (prelievo dopo 7 giorni dalla fine del trattamento). Sull'asse z sono indicati i campioni utilizzati: **f.p.t.** (foglia appartenente alla cultivar primaverile Bianca, trattata), **f.p.a.** (foglia appartenente alla cultivar primaverile Bianca, acclimatata), **r.p.t.** (radice appartenente alla cultivar primaverile Bianca, trattata), **r.p.a.** (radice appartenente alla cultivar primaverile Bianca, acclimatata), **f.a.t.** (foglia appartenente alla cultivar autunnale Franca, trattata), **f.a.a.** (foglia appartenente alla cultivar autunnale Franca, acclimatata), **r.a.t.** (radice appartenente alla cultivar autunnale Bianca, trattata), **r.a.a.** (radice appartenente alla cultivar autunnale Franca, acclimatata).

### 3.3 Analisi di trascritti differenzialmente espressi

#### 3.3.1 Caratterizzazione della libreria cDNA e sequenziamento dei TDFs

Per identificare i geni coinvolti nella risposta al freddo in *B. vulgaris*, è stata condotta un'analisi dei geni differenzialmente espressi a seguito dell'esposizione a basse temperature.

Tra le diverse tecniche, quali il *differential display*, l'SSH (Suppression Subtractive Hybridization) e la SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) si è optato per l'analisi cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), realizzata con l'impiego del sistema Polytract di Promega, al fine di garantire la massima probabilità di isolamento di un solo TDF (Transcript-Derived Fragment) per trascritto differenzialmente espresso. Questa tecnica permette di ottenere frammenti facilmente clonabili per l'ottenimento di una libreria di espressione. L'analisi cDNA-AFLP è stata condotta sia su foglia sia su radici di plantule di controllo e trattate a 0°C o a -2°C, partendo da RNA estratto con il metodo fenolo/cloroformio, la cui resa è stata di circa 200 µg di RNA totale/gr. e il cui rapporto  $A_{260}/A_{280}$  è risultato intorno a 2.0, e con bande ben definite relative all'rRNA all'osservazione su gel di agarosio. L'isolamento dell'mRNA ha dato una resa finale del 2% circa, in linea con quanto atteso poiché una cellula eucariote ha in media dall'1% al 5% di mRNA rispetto all'RNA totale, per il resto costituito da RNA ribosomiale e da tRNA.

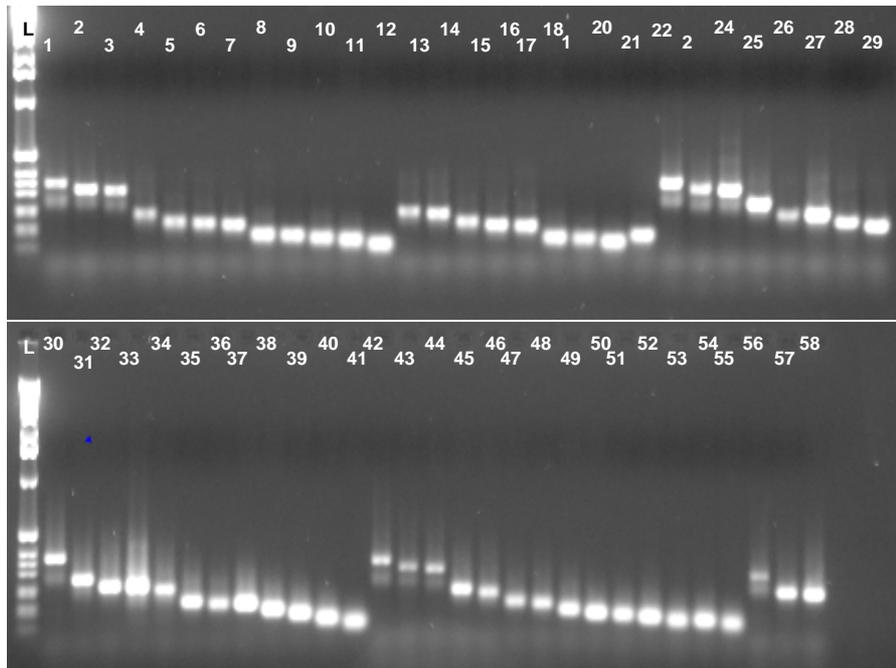
Tale metodologia ha permesso di ottenere 231 trascritti differenzialmente espressi, *down-* o *up-* regolati sia a 0°C sia a -2°C, rispetto ai controlli (tabella 3.4):

- 142 TDFs *up*-regolati e 89 TDFs *down*-regolati;
- 97 in radice e 134 in foglia.

Dopo eluizione dei TDFs da gel e ri-amplificazione usando i primer che li avevano generati, la corsa elettroforetica su gel di agarosio 2% (figura 3.18) ha consentito di verificare la presenza delle relative bande il cui peso molecolare è risultato coerente con quanto atteso in base alla valutazione preliminare su gel di poliacrilammide.

Inizialmente si è deciso di sequenziare direttamente (senza passare dalla fase di clonaggio) 7 TDFs. Tutti gli elettroferogrammi ottenuti sono risultati confusi e le sequenze derivate inutilizzabili, sia per l'elevato rumore di fondo, sia per la mancanza di picchi ben definiti, fatto che impedisce la corretta ed univoca attribuzione di una base a ciascun picco. La causa è da ricercare probabilmente nel fatto che bande che appaiono uniche anche in un gel ad alta risoluzione come quello di poliacrilammide utilizzato, sono in realtà in diversi casi costituiti da più sequenze co-migranti.

E' risultato quindi indispensabile il passaggio dalla fase di clonaggio.



**Figura 3.18-** Corsa elettroforetica su gel di agarosio di TDFs eluiti da gel di poliacrilammide e ri-amplificati. La numerazione 1-21 si riferisce al gruppo MC5 (1-12 da foglia, 13-21 da radice), 22-41 al gruppo MC6 (22-29 da foglia, 30-41 da radice), 42-58 al gruppo MC7 (42-55 da foglia, 56-58 da radice). Come marcatore di peso molecolare è stata usata 1kb DNA Ladder (Invitrogen).

E' stata ottenuta una collezione di 693 cloni, contenenti inserti di dimensioni variabili tra 20 e 400 pb, che rappresenta una libreria di espressione di barbabietola da zucchero di sequenze differenzialmente espresse in risposta al freddo nei due organi principali della bietola, foglia e radice. Il 95% di cloni è stato sequenziato con successo.

Le modifiche apportate alla tecnica cDNA-AFLP classica con l'utilizzo di un substrato paramagnetico al fine di isolare i poly (A)+, garantisce la selezione mediamente di un solo TDF per ogni trascritto, permettendo di evitare la ridondanza spesso molto presente a seguito di analisi di trascritti differenzialmente espressi. Le 257 sequenze "uniche" ottenute dopo la fase di clonaggio coprono infatti tutti i TDF di partenza, evidenziando l'assenza di ridondanza nelle sequenze ottenute.

La percentuale media di GC calcolata sull'intera libreria è del 46,3%, a differenza del 42,7% ottenuto dalla libreria di espressione ESTs ottenuta da Bellin *et al.* (2002). I valori medi di GC ottenuti nel trascrittoma di *A. thaliana* è del 44,2 % e per il riso del 51,4% (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 e Yu *et al* 2002).

frammento	primers	modulazione	pb	frammento	primers	modulazione	pb
RA1	BT/MC13	+	280	RA9	BT/MA5	+	<100
RA2	BT/MC13	+	290	RA10	BT/MA5	+	<100
RA3	BT/MC13	+	230	FO1	BT/MA5	+	110
RA4	BT/MC13	+	160	FO2	BT/MA5	-	200
RA5	BT/MC13	+	180	FO3	BT/MA5	-	190
RA6	BT/MC13	-	160	FO4	BT/MA5	+	150
RA7	BT/MC13	+	150	FO5	BT/MA5	-	100
RA8	BT/MC13	+	130	FO6	BT/MA5	+	90
RA9	BT/MC13	-	90	RA1	BT/MG5	+	200
FO1	BT/MC13	-	500	RA2	BT/MG5	+	180
FO2	BT/MC13	+	400	RA3	BT/MG5	+	160
FO3	BT/MC13	+	350	RA4	BT/MG5	+	150
FO4	BT/MC13	-	250	RA5	BT/MG5	+	150
FO5	BT/MC13	-	220	RA6	BT/MG5	+	150
FO6	BT/MC13	+	210	RA8	BT/MG5	+	150
FO7	BT/MC13	-	210	FO1	BT/MG5	+	290
FO8	BT/MC13	+	200	FO2+	BT/MG5	+	270
FO9	BT/MC13	-	190	FO2-	BT/MG5	-	250
FO10	BT/MC13	-	150	FO3	BT/MG5	-	240
FO11	BT/MC13	+	120	FO4	BT/MG5	+	220
FO12	BT/MC13	-	110	FO5	BT/MG5	+	210
FO13	BT/MC13	+	100	FO6	BT/MG5	-	150
FO14	BT/MC13	-	130	FO7	BT/MG5	+	150
FO15	BT/MC13	-	130	FO8	BT/MG5	+	150
RA1	BT/MA6	+	330	FO9	BT/MG5	+	150
RA2	BT/MA6	-	310	FO1	BT/MC14	-	290
RA3	BT/MA6	+	250	FO2	BT/MC14	-	280
RA4	BT/MA6	+	200	FO3	BT/MC14	-	270
RA5	BT/MA6	-	150	FO4	BT/MC14	+	270
RA6	BT/MA6	+	150	FO5	BT/MC14	+	250
RA7	BT/MA6	+	150	FO6	BT/MC14	+	250
RA8	BT/MA6	+	150	FO7	BT/MC14	-	230
RA9	BT/MA6	+	150	FO8	BT/MC14	+	200
RA10	BT/MA6	+	150	FO9	BT/MC14	-	200
RA11	BT/MA6	+	150	FO10	BT/MC14	+	200
FO1	BT/MA6	-	280	FO11	BT/MC14	-	150
FO2	BT/MA6	+	260	FO12	BT/MC14	+	150
FO3	BT/MA6	+	230	RA1	BT/MC14	+	320
FO4	BT/MA6	+	200	RA2	BT/MC14	-	300
FO5	BT/MA6	-	200	RA3	BT/MC14	+	280
RA1	BT/MA5	+	210	RA4	BT/MC14	+	230
RA2	BT/MA5	+	210	RA5	BT/MC14	-	120
RA3	BT/MA5	+	200	RA6	BT/MC14	+	120
RA4	BT/MA5	+	180	RA7	BT/MC14	+	120
RA5	BT/MA5	+	150	RA8	BT/MC14	+	120
RA6	BT/MA5	+	110	RA9	BT/MC14	+	100
RA7	BT/MA5	+	90	RA10	BT/MC14	-	100
RA8	BT/MA5	+	<100	RA11	BT/MC14	-	100

**Tabella 3.4 continua**

frammento	primers	modulazione	pb	frammento	primers	modulazione	pb
RA12	BT/MC14	-	100	FO6	BT/MC5	+	200
FO1	BT/MG6	+	510	FO7	BT/MC5	-	200
FO2	BT/MG6	+	400	FO8	BT/MC5	-	200
FO3	BT/MG6	-	350	FO9	BT/MC5	+	200
FO4	BT/MG6	-	340	FO10	BT/MC5	+	200
FO5	BT/MG6	+	300	FO11	BT/MC5	-	200
FO6	BT/MG6	+	240	FO12	BT/MC5	+	150
FO8	BT/MG6	-	200	RA1	BT/MC5	+	250
FO9	BT/MG6	-	190	RA2	BT/MC5	-	250
FO10	BT/MG6	-	190	RA3	BT/MC5	+	230
FO11	BT/MG6	+	150	RA4	BT/MC5	-	230
FO12	BT/MG6	+	150	RA5	BT/MC5	+	230
FO13	BT/MG6	+	150	RA6	BT/MC5	+	210
FO14	BT/MG6	+	130	RA7	BT/MC5	-	210
FO15	BT/MG6	-	130	RA8	BT/MC5	+	210
FO16	BT/MG6	-	120	RA12	BT/MC5	+	210
FO17	BT/MG6	+	120	FO1	BT/MC6	+	340
FO18	BT/MG6	+	120	FO2	BT/MC6	-	330
FO19	BT/MG6	-	120	FO3	BT/MC6	+	330
FO20	BT/MG6	-	120	FO4	BT/MC6	-	300
RA1	BT/MG6	-	210	FO5	BT/MC6	-	290
RA2	BT/MG6	+	180	FO6	BT/MC6	-	290
RA3	BT/MG6	+	150	FO7	BT/MC6	+	280
RA4	BT/MG6	+	150	FO8	BT/MC6	+	250
RA5	BT/MG6	+	130	FO9	BT/MC6	-	240
RA7	BT/MG6	-	150	FO10	BT/MC6	-	240
FO1	BT/MT5	+	420	FO11	BT/MC6	-	240
FO2	BT/MT5	-	250	FO12	BT/MC6	+	240
FO3	BT/MT5	+	240	FO13	BT/MC6	+	240
FO4	BT/MT5	+	230	RA1	BT/MC6	+	370
FO5	BT/MT5	-	200	RA2	BT/MC6	+	250
FO6	BT/MT5	+	200	RA3	BT/MC6	+	240
FO7	BT/MT5	-	180	RA4	BT/MC6	+	220
FO8	BT/MT5	-	180	RA5	BT/MC6	+	220
FO9	BT/MT5	+	170	RA6	BT/MC6	-	210
FO10	BT/MT5	-	150	RA7	BT/MC6	-	200
FO11	BT/MT5	-	120	RA8	BT/MC6	-	<200
RA1	BT/MT5	+	240	RA9	BT/MC6	+	<201
RA2	BT/MT5	+	230	RA10	BT/MC6	-	<202
RA3	BT/MT5	+	200	RA11	BT/MC6	-	<203
RA4	BT/MT5	+	190	RA13	BT/MC6	-	<204
RA5	BT/MT5	+	190	RA14	BT/MC6	-	<205
RA6	BT/MT5	+	150	FO1	BT/MC7	+	350
RA7	BT/MT5	+	150	FO2	BT/MC7	-	340
RA8	BT/MT5	-	100	FO3	BT/MC7	+	340
FO1	BT/MC5	+	340	FO4	BT/MC7	-	300
FO2	BT/MC5	-	300	FO5	BT/MC7	-	300
FO3	BT/MC5	+	220	FO6	BT/MC7	+	290
FO4	BT/MC5	-	210	FO7	BT/MC7	-	280
FO5	BT/MC5	+	210	FO8	BT/MC7	-	270

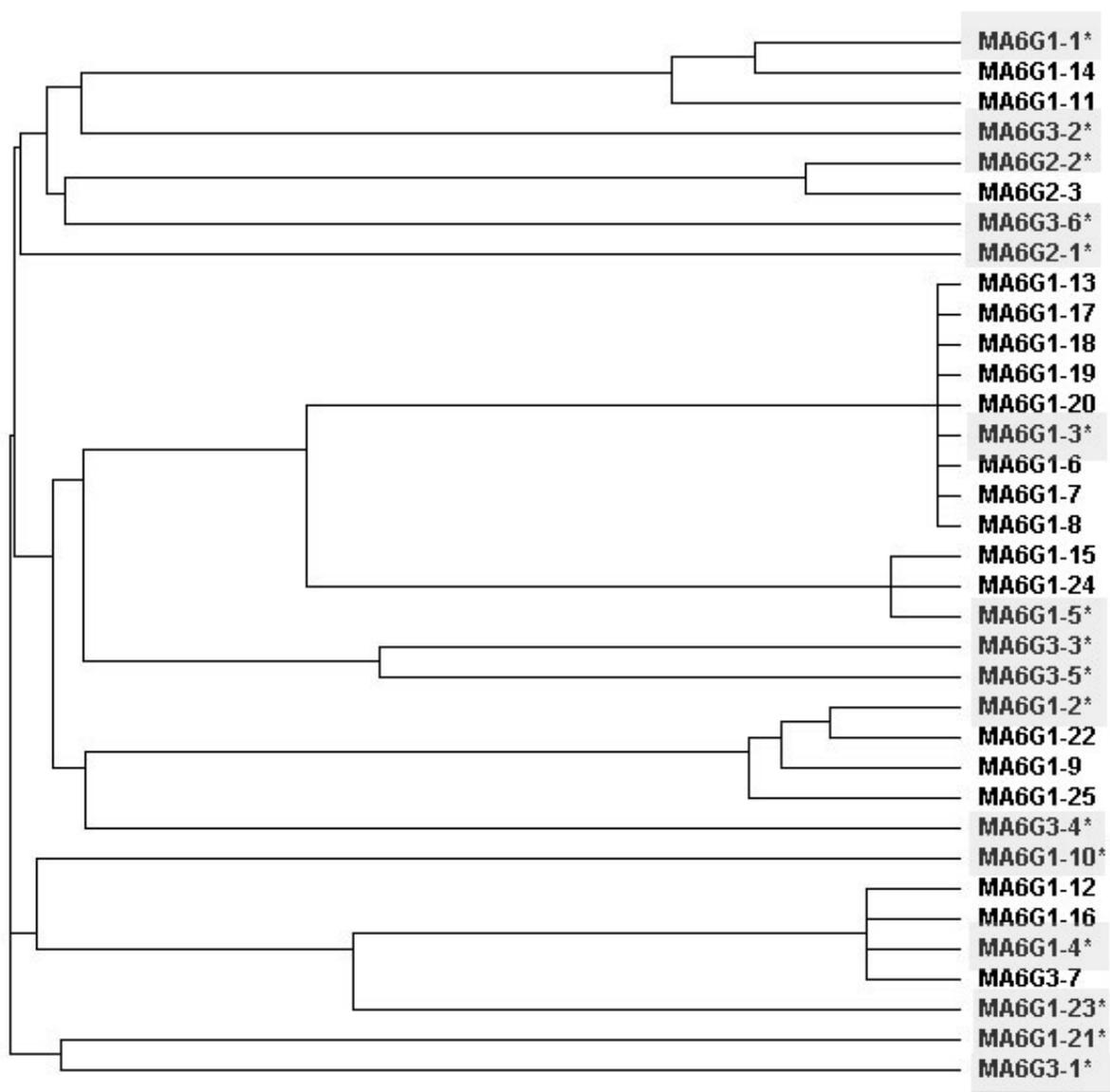
**Tabella 3.4 continua**

frammento	primers	modulazione	pb
FO9	BT/MC7	-	260
FO10	BT/MC7	+	250
FO11	BT/MC7	+	240
FO12	BT/MC7	-	230
FO13	BT/MC7	-	220
FO14	BT/MC7	+	210
RA1	BT/MC7	-	330
RA2	BT/MC7	+	300
RA3	BT/MC7	-	300
FO1	BT/MC8	+	340
FO2	BT/MC8	-	340
FO3	BT/MC8	+	340
FO4	BT/MC8	+	340
FO5	BT/MC8	-	290
FO6	BT/MC8	+	290
FO7	BT/MC8	+	290
FO8	BT/MC8	+	290
FO9	BT/MC8	-	290
FO10	BT/MC8	+	290
FO11	BT/MC8	+	290
FO12	BT/MC8	+	290
FO13	BT/MC8	-	290
FO14	BT/MC8	+	290
FO15	BT/MC8	+	290
FO16	BT/MC8	+	290
FO17	BT/MC8	+	290
RA1	BT/MC8	-	400
RA2	BT/MC8	-	350
RA3	BT/MC8	+	340
RA4	BT/MC8	-	340
RA5	BT/MC8	+	320
RA6	BT/MC8	+	320
RA7	BT/MC8	+	320
RA8	BT/MC8	+	320
RA9	BT/MC8	+	320

**Tabella 3.4**-Elenco dei frammenti eluiti da gel di poliacrilammide, amplificati e corsi su gel di agarosio. E' riportato il nome del frammento definito in funzione del tessuto (foglia: FO e radice: RA) e associato ad una numerazione crescente che indica la posizione sul gel di poliacrilammide da cui è stato prelevato. Di conseguenza a numeri più bassi corrispondono frammenti più in alto nel gel e pertanto con peso molecolare maggiore. Inoltre è riportato il nome dei primers che li ha generati e il tipo di modulazione di espressione osservata a seguito del cDNA-AFLP (indotto: +; represso:.-).

### 3.3.2 Analisi dei dati cDNA-AFLP e classificazione funzionale delle sequenze TDFs ottenute

Le sequenze, “ripulite” e trattate, come riportato nel paragrafo 2.5.7, sono state allineate per stimare il loro grado di divergenza e per individuare i TDFs unici. I software utilizzati sono Multalin e T-coffee (Notredame *et al.*, 2000), software di allineamento multiplo e globale, che ha permesso di ottenere grafici ad albero che rappresentano la vicinanza data dalla similarità tra le varie sequenze. Ogni gruppo di sequenze ottenute con la stessa coppia di primer è stato separatamente analizzato e, a seguito di ulteriori arrangiamenti dell’allineamento effettuati manualmente e di diversi cicli di allineamenti multipli, sono state ottenuti 257 TDFs unici. L’albero ottenuto per il gruppo di TDF generato dalla coppia Bsty / MA6 è mostrato in figura 3.19.



**Figura 3.19-**Immagine che evidenzia (\*in grigio), all’interno dell’albero relativo al gruppo MA6, le sequenze TDFs uniche.

37 sequenze risultate differenti all'analisi di similarità, raggruppano ugualmente in 11 *tentative consensus* (TC), ovvero rappresentano *contig* presumibilmente attribuibili allo stesso trascritto, come riportato in tabella 3.5.

TC5035	TC4294	TC5002	TC5808	TC5972	TC6824
MC13-RA1-3 MA6/G1/4 MA6/G1/23 MA6/G3/7	MG6G3/1 MG6G3/10	MC14G1-2 MC14G3-3 MC14G4-10 MC14G1-2 MC14G3-3	MC7G3-3 MC8G3-28 MC5G3-1	MC8G3-14 MC5G3-7	MC14G1-16 MC14G3-16
TC5523	TC8777	TC6944	TC7803	TC8390	
MC7G1-2 MC5G1-6	MC7G1-2 MC5G1-6 MC7G4-11	MT5-FO10-2 MT5-FO10-3	MC14G2-8 MC14G4-2	MC7G4-2 MC8G4-1	

**Tabella 3.5-** Riporta l'elenco dei TDFs che si allineano sugli stessi Tentative Consensus.

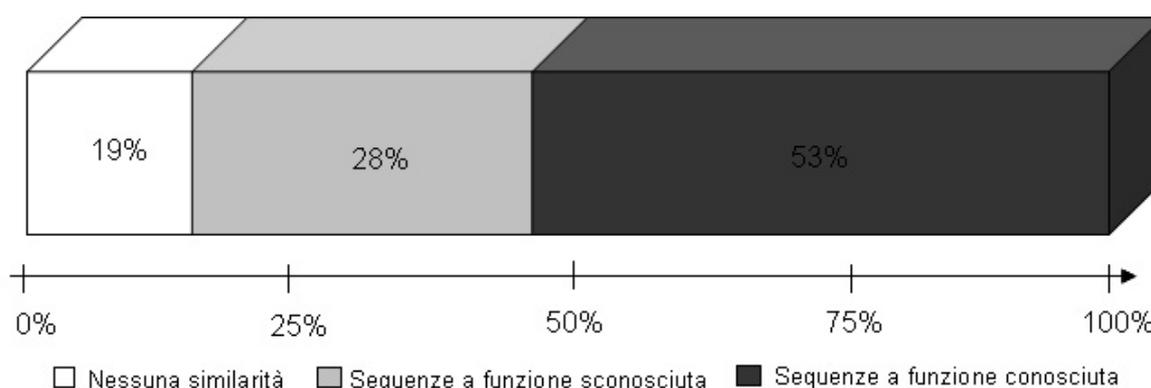
Alcune sequenze vengono modulate in maniera tessuto-specifica, e mostrano similarità con ESTs provenienti da altre librerie precedentemente ottenute: MA5RA1-1 e MA5FO1-1 sono indotte sia in foglia che in radice e risultano simili a BQ489303 (Bellin *et al*, 2002), come anche MC14G1-9 e MC14G3-15 simili a BQ585493 (Herwig *et al*, 2002), MC14G3-7 (indotta in foglia) e MC14G2-7 (repressa in radice) sono simili a BQ590336 (Herwig *et al*, 2002) e, infine, MG5G3-5 (indotta in foglia) e MC14G2-5 (repressa in radice) sono simili a EG54997 (Los Reyes *et al.*, 2006, non pubblicato)

L'elenco completo delle sequenze ottenute è riportato nell'allegato A. Ogni sequenza unica è identificata da un codice univoco: PrimerRW-Foglia/Radice-N°TDF sul gel di poliacrilammide-identificativo del clone (Esempio: MA5RA7-1). A volte il clonaggio è stato effettuato a gruppi. In questo caso, le indicazioni G1 e G2 indicano la provenienza del frammento dalla radice, e, rispettivamente, un'induzione o una repressione; mentre le indicazioni G2 e G3 indicano la provenienza dalla foglia e, rispettivamente, un'induzione o una repressione.

La caratterizzazione funzionale ha evidenziato che per il 45% di TDFs non è possibile trovare un'annotazione funzionale utilizzando gli algoritmi BLAST N e BLAST X sulle due banche dati utilizzate (BvGI e GenBank; figura 3.20):

- il 19% delle TDFs non trova una significativa similarità con alcuna sequenza in banca dati, ovvero non è possibile attribuire loro una funzione perché non c'è alcuna sequenza depositata di riferimento e viene classificata pertanto come "nessuna similarità";

- il 28% delle TDFs presenta similarità significativa con sequenze codificanti proteine dalla funzione sconosciuta o con sequenze non codificanti e viene classificato come “sequenze a funzione sconosciuta”
- il 53% delle TDFs di bietola ha invece una buona similarità con le sequenze depositate in banche dati a funzione nota, permettendo quindi di attribuire loro un’annotazione funzionale putativa e la loro classificazione in processi biologici diversi.



**Figura 3.20** - Distribuzione delle TDFs nelle 3 classi di sequenze che non trovano alcuna similarità, che trovano similarità con proteine non predette e che trovano similarità con proteine a funzione conosciuta.

Il 21% delle sequenze TDFs “a funzione sconosciuta” (MC13RA1-3, MC13RA2-4, MC13FO13-2, MC13FO13-3, MA6G3-4, MT5RA4-1, MG5G1-14, MC14G1-7, MC13FO5-8, MC13FO10-1, MT5FO2-1, MT5FO5-1, MG5G3-2, MC14G4-9, MC8G3-1), ha elevata similarità con 15 ESTs, tra le 2784, recentemente ottenute da Pestsova *et al* (2008), i quali hanno ottenuto un’ampia libreria di ESTs differenzialmente espresse in semi germinati sottoposti a molteplici stress (stress salino, idrico, osmotico e da basse temperature). Ne consegue che per tali sequenze non è possibile attribuire un coinvolgimento che sia classificabile come specifico per la risposta al freddo ma più genericamente ad uno stress osmotico.

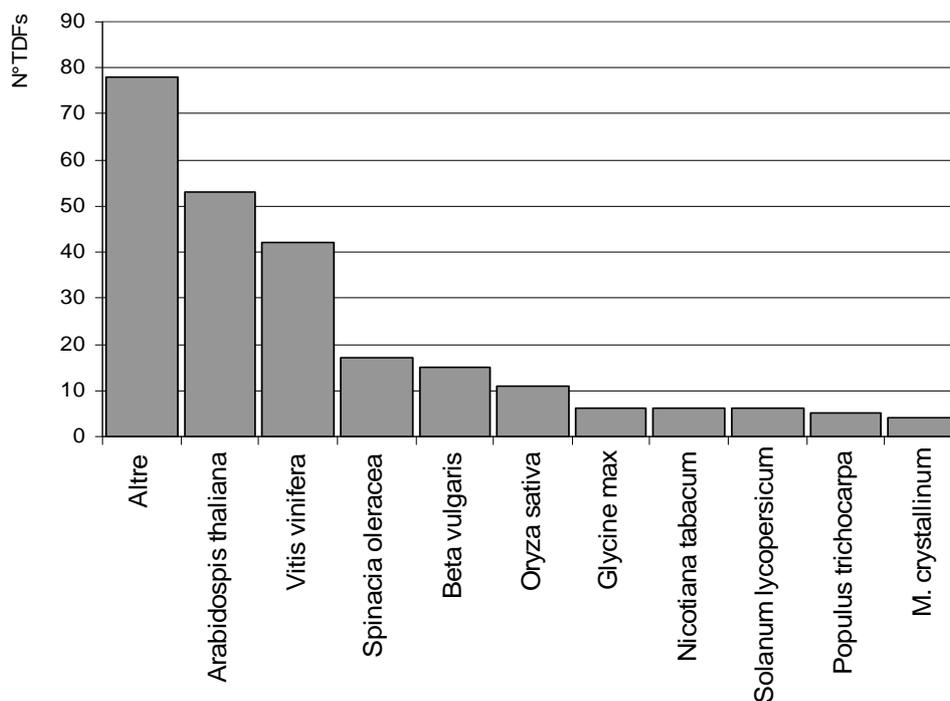
L’elenco di tutte le TDFs con le putative funzioni geniche e attribuzione a categorie funzionali è riportato nell’allegato B. Nello stesso sono indicati anche il numero di TDFs (qualora si tratti di un *contig*), la specie di appartenenza delle sequenze simili ai TDFs di *Beta vulgaris*, l’accessione di Genbank (qualora si tratti di una EST) o il numero di TCs (TIGR-BvGI).

In figura 3.21 è riportata la frequenza con cui ricorrono le specie a cui appartengono le sequenze utilizzate per l’annotazione funzionale delle ESTs, ed è possibile osservare che le specie più presenti sono *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* e *Spinacea oleracea*.

Le sequenze per cui è stato possibile effettuare una predizione funzionale sono state suddivise in 17 categorie funzionali:

- metabolismo dei nucleotidi, soprattutto adenina;

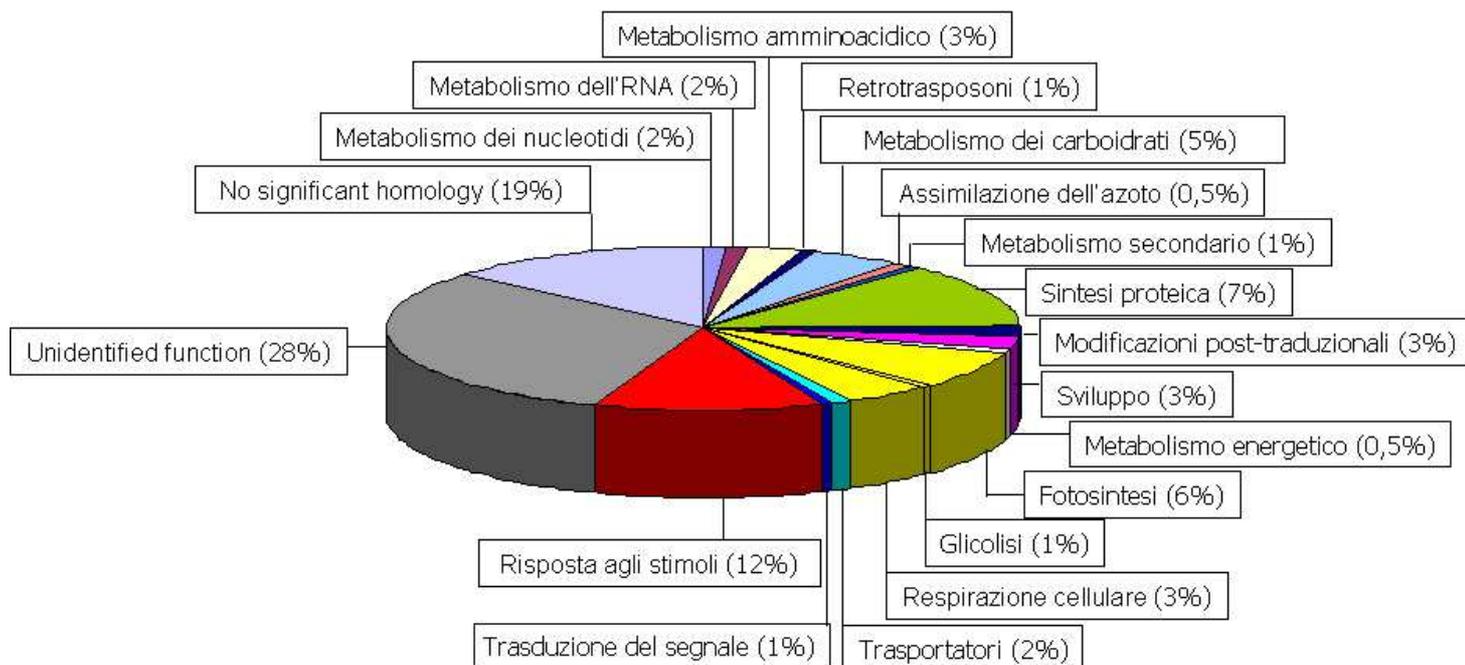
- metabolismo dell'RNA, tra cui geni codificanti per alcune ribonucleasi e fattori coinvolti nello splicing alternativo;
- metabolismo amminoacidico, per la maggior parte della metionina e della tirosina;
- metabolismo dei carboidrati, comprendente anche geni coinvolti nel metabolismo dell'amido e del saccarosio (fruttosio bifosfato aldolasi);
- metabolismo secondario, comprendente geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi, degli acidi grassi, dei flavonoli e di altri composti secondari;
- modificazioni post-traduzionali, tra cui fosfatasi, chinasi e proteine che legano l'ubiquitina,
- sviluppo, tra cui geni coinvolti nella divisione cellulare e nello sviluppo dell'organismo;
- assimilazione dell'azoto;
- metabolismo energetico;
- fotosintesi;
- glicolisi;
- respirazione cellulare;
- trasduzione del segnale, comprendente geni che codificano per proteine coinvolte nella percezione e nella trasmissione del segnale nella cellula;
- trasportatori, comprendente carrier e proteine di membrana che consentono il trasporto di molecole di diversa natura;
- retrotrasposoni;
- sintesi proteica, soprattutto geni codificanti proteine ribosomiali e fattori di regolazione della traduzione (elongation factor 1 alfa);
- risposta agli stimoli, comprendente anche geni codificanti enzimi con attività antiossidante.



**Figura 3.21-** Specie a cui appartengono le sequenze simili ai TDFs di *Beta vulgaris*.

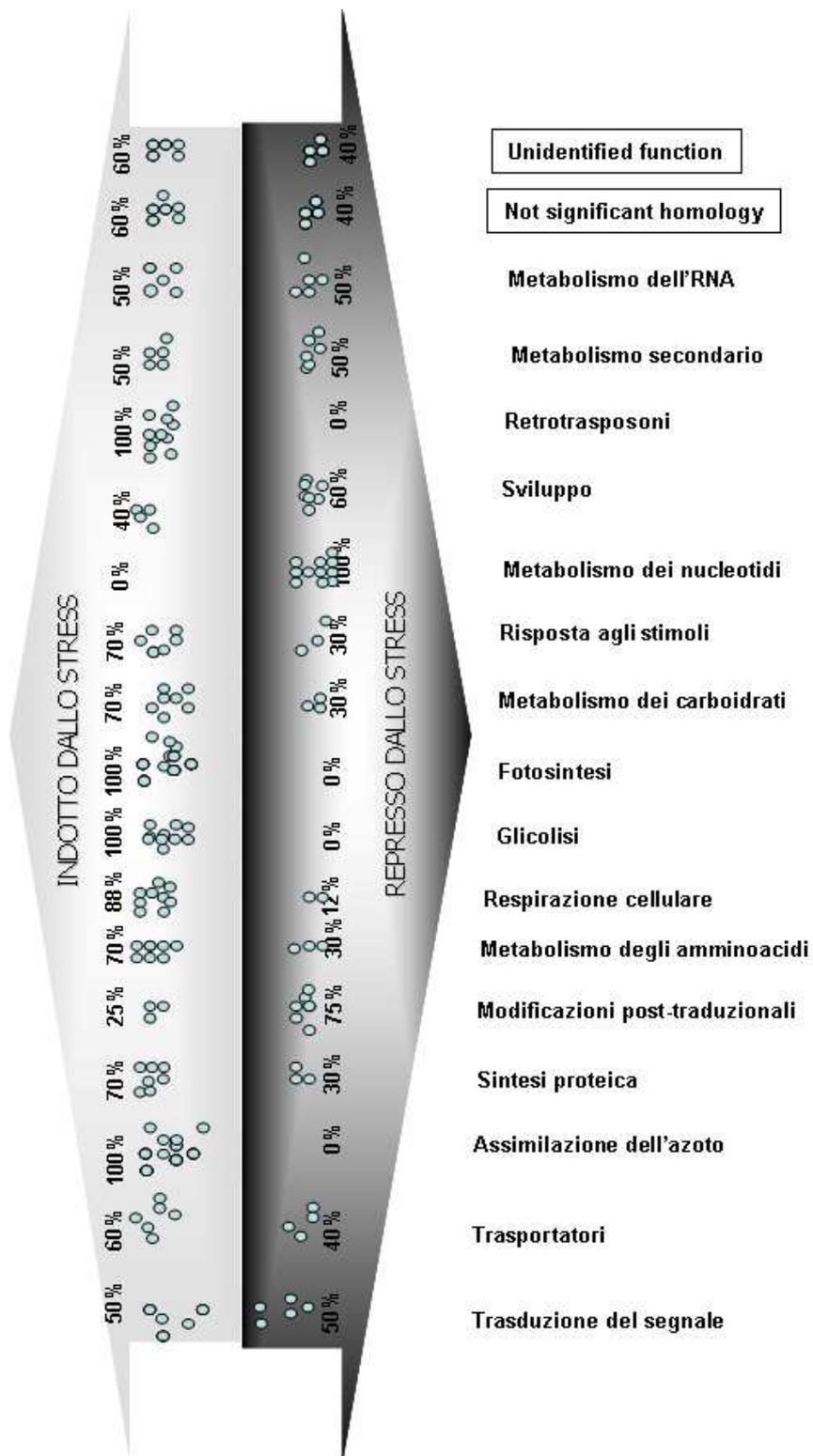
La distribuzione delle sequenze TDFs in queste categorie è riportata nella figura 3.22, dove appare evidente che il set più ampio è quello dei geni a funzione sconosciuta, seguito da quello che comprende i geni che rispondono agli stimoli (12%), coinvolti nel metabolismo energetico (complessivamente 10,5%) e da quelli coinvolti nel metabolismo dei carboidrati (5%).

Tra questi, secondo l'attribuzione funzionale prevista dal Gene Ontology, la suddivisione per funzione molecolare attribuisce alla maggior parte dei geni funzione catalitica (il 49%), seguita dalla funzione di *binding* (il 22%). Nel rimanente 29% si collocano quelle funzioni per cui non è stato possibile attribuire una collocazione con Gene Ontology e quelle che comprendono l'attività di trasporto, l'attività strutturale e di regolazione enzimatica. Questi dati si trovano in linea con quelli relativi ad un'analisi complessiva dei TCs *Beta*-specifici presenti nel "Beta Vulgaris Gene Index", che appartengono per il 40% alla categoria "attività catalitica" e per il 38% alla categoria "binding".

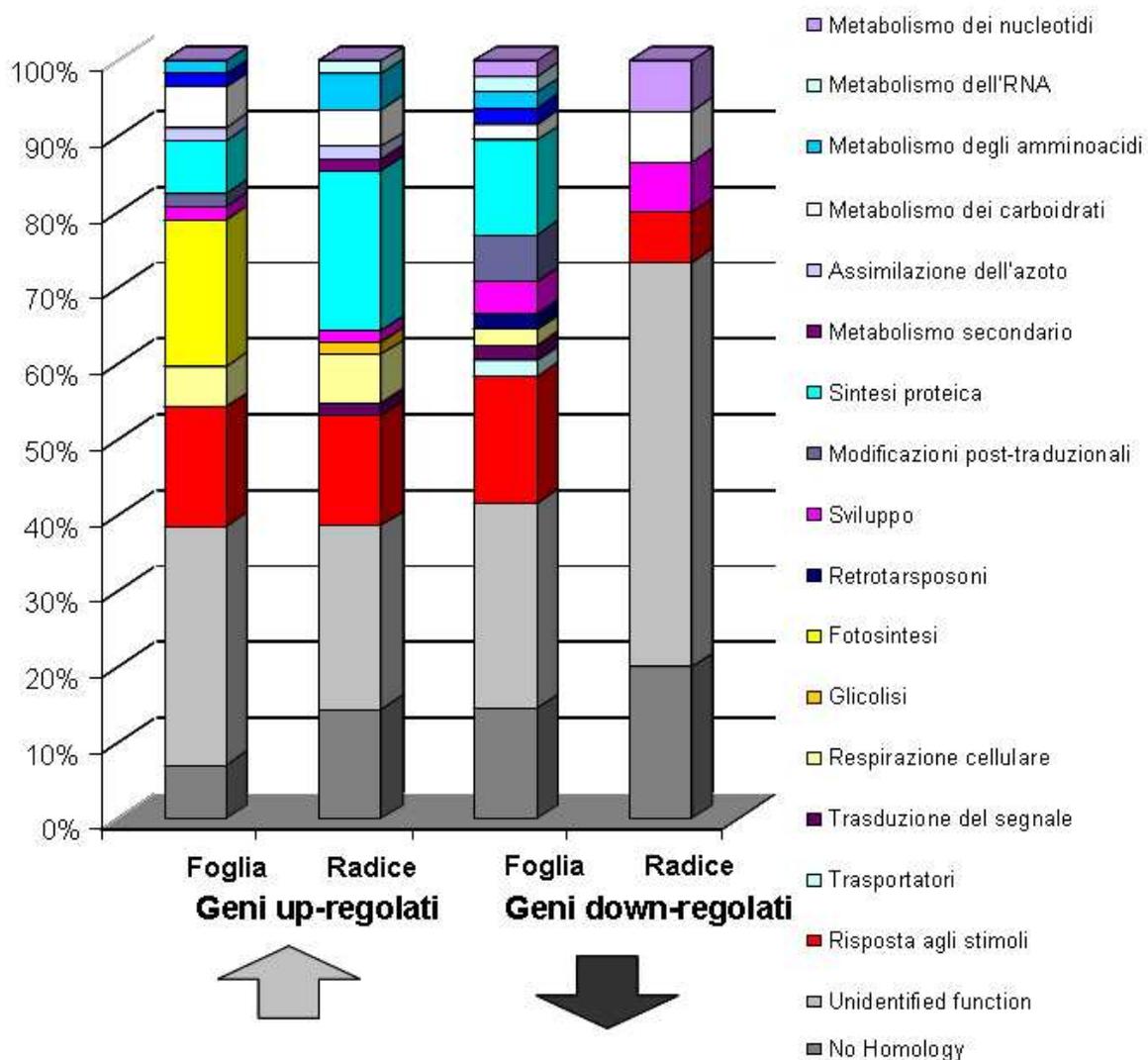


**Figura 3.22-** Distribuzione dei TDFs sulla base della suddivisione in 17 categorie funzionali.

La figura 3.23 mostra che tra le sequenze *up*-regolate la maggior parte sono coinvolte nei processi di traduzione delle proteine, metabolismo degli aminoacidi, metabolismo dei carboidrati, metabolismo energetico e risposta agli stress. Per quanto riguarda invece le sequenze *down*-regolate, la maggior parte sono coinvolte nel metabolismo dei nucleotidi e nelle modificazioni post-traduzionali. Lo sviluppo, il metabolismo dell'RNA, i trasportatori e la trasduzione del segnale sono invece categorie che vengono equamente indotte e represses a livello di espressione genica in risposta alle basse temperature. Allo stesso modo, le sequenze per le quali non è stato possibile predire una funzione genica sono sia indotte sia represses.



**Figura 3.23-** Distribuzione dei TDFs sulla base della modulazione in risposta al trattamento con le basse temperature e sulla base della suddivisione in categorie funzionali.



**Figura 3.24-** Classificazione delle TDFs in funzione della modulazione in risposta alle basse temperature e in funzione dell'organo di appartenenza.

Come mostrato in figura 3.24, tra le sequenze *up-*regolate in foglia, la maggior parte riguardano il metabolismo energetico ed in particolare la fotosintesi, mentre tra le *down-*regolate la maggior parte delle classi funzionali è rappresentata. In radice, la maggior parte delle sequenze indotte riguardano la sintesi proteica e il metabolismo degli amminoacidi. Le sequenze indotte da stress/stimoli e quelle a funzione sconosciuta sono molto presenti e ben distribuite in tutte le categorie.

Nonostante la funzione assegnata a ciascuna sequenza, essendo basata solo sulla similarità, non sia da considerare esaustiva e necessiti di ulteriori verifiche, è stato possibile suddividere il 51% delle sequenze sulla base dell'appartenenza alle diverse categorie funzionali e pertanto correlarle ad un loro putativo ruolo nella risposta alle basse temperature.

La maggior parte dei geni sono stati classificati come “risposta agli stimoli”, in quanto sono coinvolti specificamente nella percezione, nella trasmissione del segnale di stress e nei meccanismi di difesa della pianta. Questa classe comprende geni non ascrivibili alle altre categorie e per le quali è noto un coinvolgimento nella risposta allo stress. Inoltre, appartengono a questa categoria quei geni che codificano per enzimi deputati all’attività antiossidante che la cellula mette in atto per difendersi dai ROS (reactive oxygen species) che possono danneggiare le componenti cellulari, quali lipidi, acidi nucleici, carboidrati e proteine. Questi geni, sono tutti indotti, nel nostro sistema sperimentale, sia in foglia sia in radice, e comprendono una ascorbato perossidasi, una ascorbato riduttasi ed una proteina PtxA, componente della fosfotransferasi, coinvolta anch’essa nel metabolismo dell’ascorbato, e una glutaredossina. Alcune metallotionine sono state anche individuate, come pure alcune HSP 70 e 90 (*heat shock protein*) che, al contrario di quanto riportato in *Arabidopsis*, nel nostro sistema sperimentale vengono repressi (Wang *et al.*, 2004). Alcuni geni coinvolti nel segnale mediato dall’etilene sono stati individuati come indotti sia in foglia sia in radice, come riportato anche da Fowler e Thomashow (2002) che individuano nella fase precoce della risposta di *A. thaliana* alle basse temperature un’induzione dell’espressione di fattori di trascrizione responsivi all’etilene.

In *A. thaliana* è noto che molti trascritti coinvolti nella trasduzione del segnale subiscono una modulazione dell’espressione genica in risposta al freddo (Seki *et al.*, 2002; Shinozaky *et al.*, 2002). In *Beta vulgaris*, alcune sequenze coinvolte nella trasmissione, ma non nella percezione del segnale, sono differenzialmente espresse in risposta al trattamento da basse temperature. MAT5RA2-1 e MT5FO6-3, codificanti due proteine indotte dall’acido jasmonico, e probabilmente coinvolte nella trasmissione del segnale in seguito a stress, risultano indotte sia in foglia che in radice in risposta al trattamento sia a 0°C sia a -2°C. E’ noto infatti che nelle piante, l’acido jasmonico e i suoi derivati sono utilizzati come elicitori per indurre la produzione di metaboliti secondari coinvolti nella difesa chimica della pianta in risposta a stress biotici e abiotici. In orzo, ad esempio, è stato dimostrato che lo jasmonato si accumula in risposta a diversi stress osmotici (Lehmann *et al.*, 1995). Tra le sequenze annotate come coinvolte nella trasduzione del segnale, si trova una calcineurina, repressa in foglia e putativamente coinvolta nella trasduzione del segnale mediata dal calcio, a testimonianza di un coinvolgimento di questa via anche nella risposta al freddo in *Beta vulgaris*. Allo stesso modo anche il metabolismo del fosfatidilinositolo è noto per essere coinvolto nella risposta allo stress ed è stato infatti ipotizzato essere un precursore per la generazione di un secondo messaggero (Sun *et al.*, 2007), suggerendo un coinvolgimento delle sequenza MT5-RA7-1, codificante per un inositolo fosfato-chinasi, ed indotta in radice, nella trasduzione del segnale in risposta alle basse temperature. Due fosfatidilinositolo chinasi, al

contrario, sono state osservate essere represses in *Arabidopsis* dopo 10 minuti di esposizione alle basse temperature (Lin *et al.*, 2004). Al contrario, i nostri risultati non mostrano alcuna evidenza di un coinvolgimento dell'ABA nella risposta al freddo in *Beta vulgaris*.

Il metabolismo energetico e quello dei carboidrati sono categorie funzionali a cui sono state attribuite molte sequenze, tra queste sono presenti prevalentemente sequenze coinvolte nella glicolisi (una fosfoglucomutasi e una fosfofruttochinasi), nella gluconogenesi (fosfoenolpiruvato carbossichinasi) e diversi enzimi coinvolti nella fotosintesi (tra questi, un'anidrasi carbonica, necessaria per la fissazione della CO<sub>2</sub>, due "*chlorophyll-binding proteins*" componenti del fotosistema II, un precursore della plastocianina, componente del citocromo *b<sub>6</sub>f*, la subunità 4 del fotosistema I, etc.). Al contrario di quanto riportato in diversi studi che osservano una repressione dei geni coinvolti nella fotosintesi in risposta al freddo (Fowler e Thomashow, 2002; Seki *et al.*, 2002), l'analisi dei frammenti ottenuti da cDNA-AFLP ha permesso di osservare un aumento dei trascritti di vari geni coinvolti nel processo fotosintetico, citando in particolare le proteine del fotosistema II (PSII) chlorophyll a-binding LHCb1.2 protein, la plastocianina, la *oxygen-evolving enhancer protein 1*. Una induzione della trascrizione dei geni delle proteine LHCII di tipo I è stata riportata anche in orzo sottoposto a basse temperature (Atienza *et al.*, 2004) e può essere spiegata come adattamento del sistema dell' antenna ad un eccesso di energia dovuto a condizioni che limitano l'utilizzo di energia come ad esempio il freddo (Purisheimo *et al.*, 2001).

La degradazione proteica è una categoria poco rappresentata in termini di TDFs di appartenenza, ma piuttosto importante in quanto regola la concentrazione proteica e controlla la presenza di proteine danneggiate, ad esempio dallo stress stesso. Nel nostro sistema le sequenze individuate sono complessivamente indotte e, tra le più rappresentate, troviamo quelle codificanti il proteasoma 26S e una codificante per una ligasi ubiquitina-proteina. Il meccanismo più importante nel controllo della degradazione proteica è infatti quello che riguarda il *pathway* ubiquitina-proteasoma che prevede che la proteina *target* venga legata a molecole di ubiquitina perché possa essere riconoscibile dal proteosoma stesso. Gli studi di Liu *et al.* (2002) mostrano inoltre che la degradazione proteica è un meccanismo attivamente coinvolto nella risposta della pianta agli stress.

Alcuni frammenti *up*-regolati in radice di bietola sono stati annotati come fattori coinvolti nel processo di splicing dell'RNA (splicing factor 35 e splicing coactivator subunit SRm300) e nel metabolismo dell'RNA (Ribonucleasi p). Queste osservazioni si vanno ad inserire in un contesto più ampio che identifica i processi di metabolismo e modificazione dei trascritti primari come indispensabili alla cellula vegetale per la sintesi di prodotti diversi a partire da un unico gene, in risposta all'adattamento a stress ambientali, come lo stress da freddo (Mastrangelo *et al.* 2005; Lee *et al.* 2006). Allo stesso modo, l'aumento della livello di trascritto relativo alla Ribonucleasi p in

seguito all'esposizione a basse temperature è coerente con l'aumento dell'attività enzimatica in radici di soia sottoposte a stress da freddo osservata da Stepinski (2002). Un'ipotesi plausibile è che la cellula vegetale necessiti di riorganizzare l'insieme di messaggeri in seguito all'instaurarsi delle nuove condizioni ambientali, eliminando quei messaggeri danneggiati dallo stress stesso.

E' noto che uno dei meccanismi principali di risposta al freddo è la stabilizzazione della membrana cellulare tramite cambiamenti nella composizione lipidica. L'alterata espressione della sequenza MG5G2-5 codificante una putativa squalene sintasi, indotta in foglia, e della sequenza MC13FO12-3 una lipoamide deidrogenasi, repressa in radice, testimoniano una possibile modificazione del metabolismo lipidico in seguito alle basse temperature. La S-adenosil metionina decarbossilasi, enzima chiave della sintesi della spermidina e spermina, note per essere coinvolte nella stabilizzazione nelle membrane, nel nostro sistema sperimentale è repressa forse a testimoniare un mancato adattamento al trattamento termico (Li e Chen, 2000). Anche la sequenza MA5FO1-1, indotta in foglia, e codificante la citocromo P450-reduttasi, coinvolta nel metabolismo degli acidi grassi, testimonia un coinvolgimento di questo metabolismo in risposta allo stress, anche se va sottolineato che questa famiglia di proteine è coinvolta in una grande varietà di reazioni ed in una vasto spettro di vie metaboliche.

L'espressione coordinata di un ampio set di geni è responsabile di tutti i cambiamenti che avvengono nella cellula in risposta gli stress e, pertanto, non si può escludere che alcune delle risposte da noi osservate non siano genericamente ascrivibili alla risposta della pianta allo stato di stress, piuttosto che ad una risposta specifica al freddo. Molte piante, come difesa da agenti biotici o abiotici, reagiscono infatti coinvolgendo processi comuni, tra cui alcuni di quelli da noi riportati. Ad esempio, una risposta piuttosto diffusa è la degradazione degli zuccheri associata alla necessità energetica della cellula per far fronte allo stress. Inoltre, la via dell'acido jasmonico, come quella dell'etilene, sono anche note per essere coinvolte nella senescenza fogliare, di conseguenza è anche possibile che in seguito al freddo si attivi il processo di senescenza o che le due vie di trasduzione del segnale, almeno in parte, si sovrappongano.

Un interessante sviluppo di questo lavoro potrebbe essere quello di ricercare nel bacino di sequenze da noi ottenute, di cui precedentemente non era stata riportata alcuna correlazione con la risposta al freddo, quelle putativamente ascrivibili in maniera specifica a tale via.

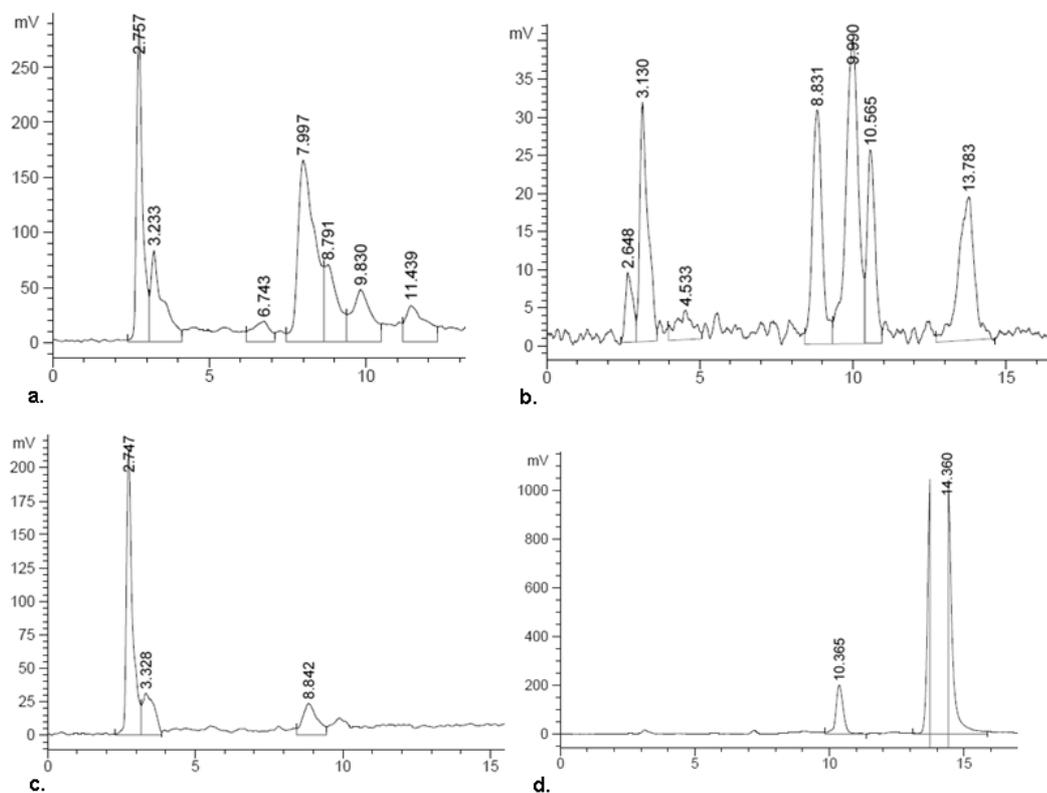
### **3.4 Analisi del contenuto dei metaboliti in risposta alle basse temperature**

Ad una modulazione dell'espressione genica non corrisponde necessariamente e univocamente un analogo profilo di espressione metabolica, a causa dei meccanismi di regolazione

post- trascrizionali, post-traduzionali e di regolazione enzimatica. Pertanto, abbiamo condotto un'analisi del contenuto di metaboliti sia mirata al rilevamento dei carboidrati sia ad ampio spettro.

### HPLC-ELSD

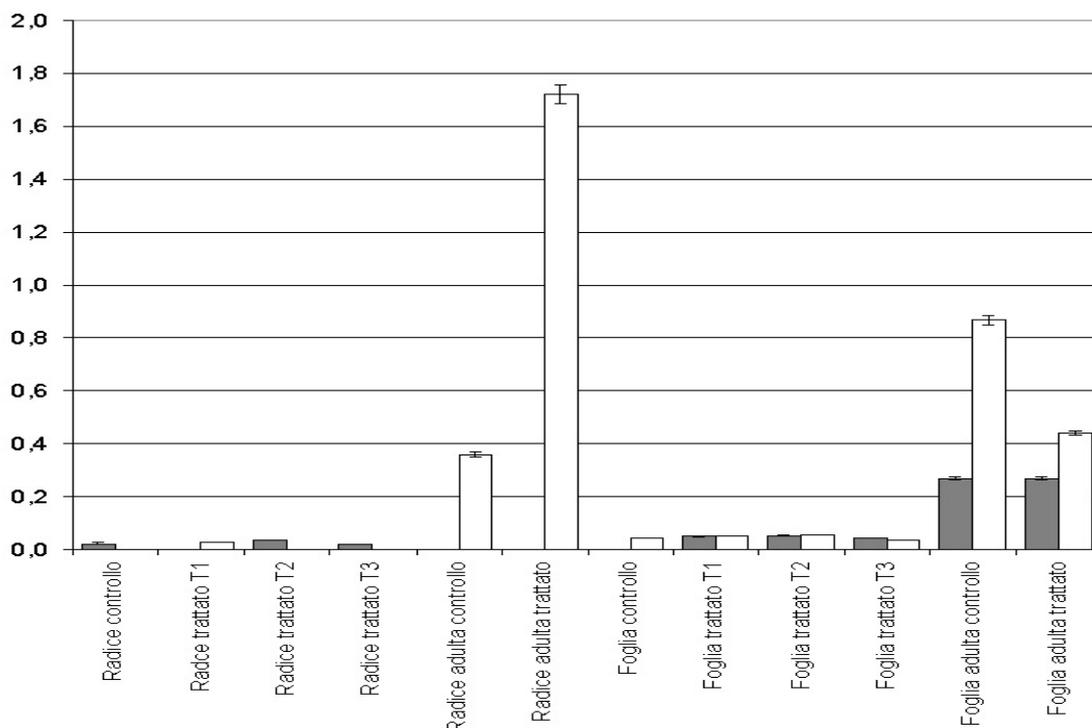
Abbiamo valutato se la modulazione dei geni analizzati determinasse una variazione nei livelli di glucosio, fruttosio e saccarosio prodotti da plantule di 24 giorni trattate e non trattate e se questo si riflettesse su cambiamenti permanenti in piante adulte. E' stato misurato il quantitativo di questi metaboliti utilizzando l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) associata ad un detector ELSD, ed utilizzando come riferimento standard relativi al glucosio, fruttosio e saccarosio (Figura 3.25).



**Figura 3.25** - Cromatogrammi HPLC di una foglia trattata a  $-2^{\circ}\text{C}$  per 5 ore di una plantula di 24 giorni della cv.Bianca (a.), di una foglia trattata a  $-2^{\circ}\text{C}$  per 5 ore di una plantula di 24 giorni della cv.Bianca, dopo due mesi dal trattamento (b.), di una radice trattata a  $-2^{\circ}\text{C}$  per 5 ore di una plantula di 24 giorni della cv.Bianca (c.) e di una radice trattata a  $-2^{\circ}\text{C}$  per 5 ore di una plantula di 24 giorni della cv.Bianca (d.) dopo due mesi dal trattamento. In ascisse, i tempi di ritenzione (min): fruttosio (8.74-8.94) e glucosio (9.78-10.30); e in ordinate intensità del segnale (mV).

L'effettiva concentrazione di singoli carboidrati in foglie e radici di plantule di controllo e trattate mostra che il contenuto in glucosio e fruttosio non cambia in seguito al trattamento con basse temperature, e che il saccarosio in piante di 24 giorni non è rilevabile. Inoltre, estratti da piante adulte (trattate al 24esimo giorno e poi fatte crescere per un ulteriore mese in terra ed in condizioni controllate) non mostrano una concentrazione significativamente diversa tra controlli e trattati per il contenuto di glucosio, fruttosio e saccarosio. In particolare, il saccarosio è risultato rilevabile solo nella radice, ad una concentrazione media pari al 9% (mg zucchero/mg radice) nel trattato e al 8% (mg zucchero/mg radice) nel controllo.

Confrontando questi dati con quelli relativi all'espressione dei geni per il metabolismo dei carboidrati, è possibile osservare che, nonostante ci sia una risposta a livello di espressione genica, questa non si ripercuote in una variazione permanente nel contenuto in saccarosio nella pianta adulta.



**Figura 3.26-** Livelli, espressi in percentuale, nel contenuto di glucosio (in bianco) e del fruttosio (in grigio) nei campioni analizzati.

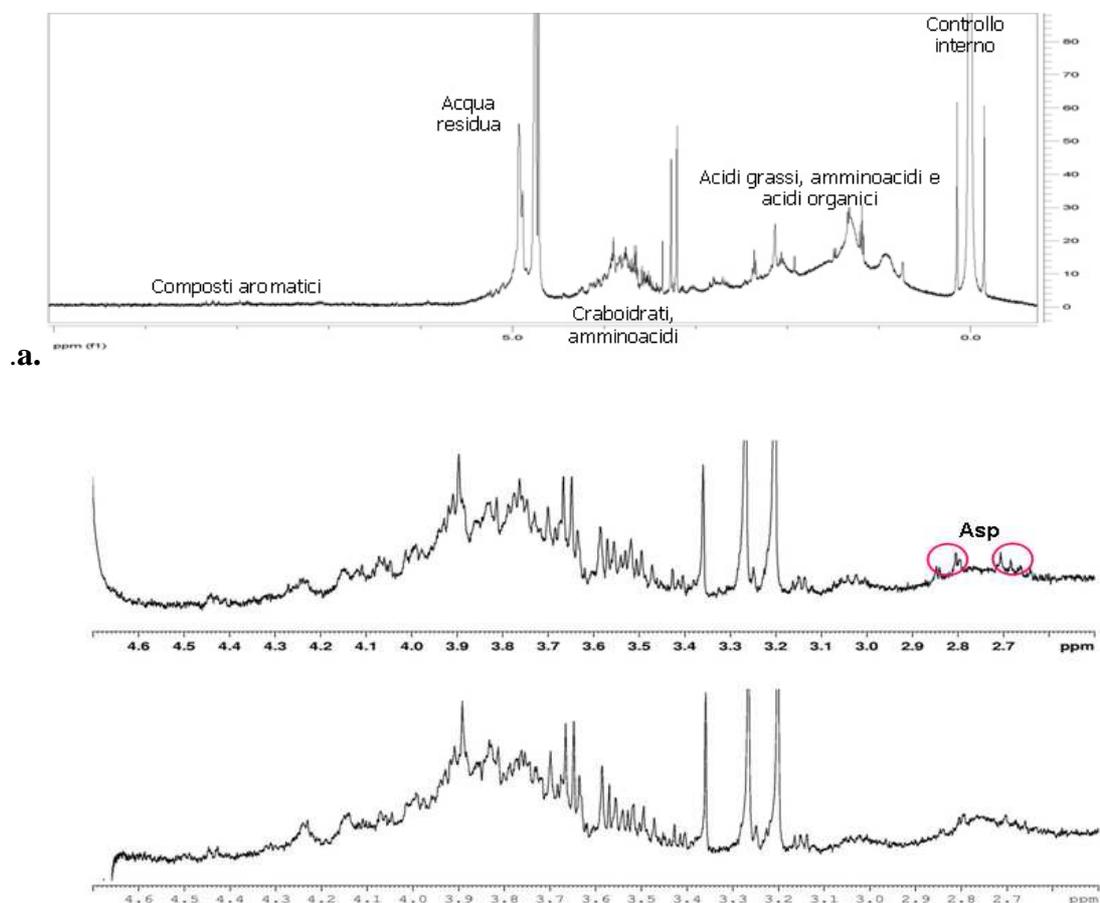
### <sup>1</sup>H-HRMAS-NMR

Il vantaggio della tecnica <sup>1</sup>H-HRMAS-NMR (High Resolution Magic Angle Spinning-Nuclear Magnetic Resonance) è che non si rende necessaria alcuna estrazione/manipolazione o preparazione chimica/fisica che potrebbe alterare il campione. Il campione infatti invece che essere portato in soluzione, è analizzabile semplicemente sospendendolo in un tampone adeguato. Inoltre,

la tecnica NMR, a differenza dell'HPLC, fornisce una visione globale delle classi metaboliche presenti.

Nonostante il basso rapporto segnale/rumore riscontrato, dall'analisi tramite  $^1\text{H}$ -HRMAS-NMR, abbiamo osservato che la concentrazione di alcuni amminoacidi, quali asparagina (ASN), aumenta nelle piante trattate alle basse temperature, a differenza dei carboidrati che, anche con quest'analisi, non mostrano differenze di concentrazione tra controlli e trattati.

L'assegnazione dei picchi di maggiore rilievo è stata fatta grazie ad esperimenti 2D in cui circa 15 specie biochimiche sono state riconosciute. In figura 3.27, è riportato un esempio dei cromatogrammi ottenuti. I nostri risultati suggeriscono che, ad una variazione della modulazione dell'espressione di geni selezionati per il loro coinvolgimento nella determinazione del carattere di interesse, non corrisponde una variazione nel contenuto di glucosio e fruttosio.



**b.**

**Figura 3.27-** Riporta lo spettro  $^1\text{H}$ -HRMAS-NMR usato per definire il profilo metabolico di una foglia di una plantula appartenente alla cv, Bianca non trattata (**a.**). In figura **b.** il confronto tra i due campioni trattato/controllo nella regione spettrale 2.50-4.70 ppm, mostra l'aumento del contenuto di amminoacidi dopo l'esposizione alle basse temperature.

Concludendo, i nostri risultati suggeriscono che i cambiamenti nei trascritti dei geni studiati non influiscono nè sul livello di saccarosio in plantule di 24 giorni, nelle quali peraltro il saccarosio è presente solo in quantità non rilevabili alla determinazione con l'HPLC, nè sul suo contenuto in piante adulte. La produzione di saccarosio è stata valutata su piante di due mesi, e i risultati di tale analisi hanno rivelato che la produzione di saccarosio, rilevabile solo in radice, non è alterata in maniera significativa. Analogamente, anche l'analisi ad ampio spettro condotta tramite NMR non riporta delle differenze nel contenuto in carboidrati, mentre l'analisi del trascrittoma mediante cDNA-AFLP rileva delle variazioni notevoli a carico di sequenze putativamente annotate come coinvolte nel metabolismo dei carboidrati.

## 4. Conclusioni

Obiettivo del progetto di dottorato è stato quello di approfondire la risposta molecolare di *Beta vulgaris* alle basse temperature tramite un approccio prevalentemente trascrittomico, integrato con analisi fisiologiche e metaboliche. La strategia scelta rappresenta il primo e fondamentale passaggio per l'identificazione dei meccanismi molecolari alla base di tale risposta basandosi sull'analisi dei geni legati al carattere di maggiore interesse per questa specie, la qualità e resa in saccarosio. La ricerca di putativi geni candidati, non ancora identificati, ha il fine di mettere a punto un procedimento sperimentale di supporto all'attività di miglioramento genetico

L'identificazione dei meccanismi molecolari che controllano la risposta al freddo nelle piante è un prerequisito fondamentale per il miglioramento genetico varietale. Inoltre, l'identificazione di sequenze differenzialmente espresse putativamente correlate alla resa e qualità del saccarosio e la loro localizzazione in mappe genetiche che comprendono anche ESTs legate al metabolismo dei carboidrati, rivelerà se la loro localizzazione cromosomica coincide con quella di alcuni QTLs identificati per questo carattere complesso, potrà essere un importante passaggio per successivi programmi di miglioramento genetico (Schneider *et al.*, 2001).

Il lavoro svolto ha consentito la caratterizzazione molecolare di 12 geni candidati tra quelli noti per codificare funzioni che rappresentano il “collo di bottiglia” nel controllo di caratteri complessi, quali il metabolismo di carboidrati e la risposta agli stress abiotici. La loro caratterizzazione, basata su una valutazione degli andamenti nel tempo dei livelli trascrizionali, piuttosto che sulla focalizzazione su di un unico momento, di per se non esaustiva, ha rivelato una risposta a livello di espressione differenziale sia a livello di tempi di risposta che di induzione/repressione. Ad esempio, il cambiamento di espressione dei geni legati alla sintesi e degradazione del saccarosio si evidenzia soprattutto nelle prime fasi di risposta. I risultati ottenuti confermano che la 1,6 fruttosio bifosfatasi ha un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo del saccarosio e definiscono una specificità di risposta alle basse temperature in relazione alla varietà in esame. Le analisi condotte in seguito ad acclimatamento a 6°C invece che a seguito di shock termico a 0°C o a -2°C, evidenziano, solo per alcune funzioni geniche, che questa fase potrebbe essere percepita dalla pianta come uno stress vero e proprio più che come un *hardening* che induce una maggior resistenza ad ulteriore abbassamento delle temperature. Tale ricerca è stata inoltre arricchita da un confronto tra due varietà selezionate per areali climatici differenti permettendo di focalizzare l'attenzione su importanti nodi metabolici coinvolti nella risposta alle basse temperature

I diversi profili di espressione genica evidenziati per la cv. Bianca e la cv. Franca riflettono un diverso comportamento, dimostrato in questa tesi con una valutazione della tolleranza

dei tessuti alle basse temperature, condotta tramite analisi del danno cellulare su organi delle due cv. esposti alle basse temperature. I risultati sottolineano un comportamento superiore della cv. Franca presumibilmente spiegabile con il processo di selezione finalizzato al miglioramento varietale per la semina autunnale. I risultati suggeriscono l'ipotesi di un'attivazione del flusso di carboidrati verso il metabolismo energetico piuttosto che il loro accumulo in saccarosio, evidenziato in particolare in Franca a livello della modulazione dell'espressione della fruttosio 1,6 bifosfatasi. La modulazione osservata non si riflette però, all'analisi con HPLC, in cambiamenti nel contenuto di glucosio, fruttosio e saccarosio e non si ripercuote in maniera permanente su piante adulte.

Un'analisi su vasta scala del trascrittoma, non focalizzata pertanto esclusivamente sul metabolismo del saccarosio, ha consentito, tramite la tecnica del cDNA-AFLP, di identificare 257 sequenze differenzialmente espresse, che saranno a breve depositate in banca dati; la condivisione dei risultati con la comunità scientifica è un importante obiettivo di questa attività di ricerca, in quanto mira a promuovere il miglioramento genetico e la diffusione di nuove varietà di *Beta vulgaris*, specialmente in Italia, fortemente penalizzata a seguito della Riforma OCM dello zucchero e che pertanto necessita della costituzione di nuovi genotipi varietali per il recupero della competitività perduta.

Le 257 sequenze ottenute e annotate, tramite predizione funzionale basata sulla similarità di sequenza, sono state classificate in categorie funzionali, che hanno permesso di rivelare i processi biologici maggiormente coinvolti nella risposta al freddo, almeno a livello di espressione genica. Inoltre l'ampio bacino di sequenze ancora a funzione sconosciuta potrebbe risultare particolarmente interessante per l'identificazione di nuovi *cold responsive genes*. Complessivamente i risultati di maggiore interesse hanno riguardato il metabolismo dei carboidrati, che risulta complessivamente attivato sia in foglia sia in radice in seguito ad esposizione a basse temperature, analogamente a quanto osservato con le analisi real-time PCR. Le analisi NMR hanno confermato però che il contenuto di carboidrati non subisce cambiamenti significativi, mentre al contrario, all'attivazione dell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo amminoacidico corrisponde, in effetti, un aumento nel loro contenuto.

Dal complesso dei risultati ottenuti l'ipotesi maggiormente plausibile è che la regolazione del metabolismo degli zuccheri a livello trascrizionale non si rifletta a livello metabolico a causa di successivi livelli di controllo che potrebbero implicare attivazioni a livello proteico o di regolazione enzimatica.

Per concludere, il lavoro condotto propone una strategia integrata "dry/wet" per combinare strumenti bioinformatici e sperimentali, con l'utilizzo di tecniche molecolari ad alta produttività, al fine di consentire di colmare i gap derivanti dalla ridotta conoscenza molecolare di *Beta vulgaris*.

Inoltre, i geni di riferimento per la normalizzazione dei dati di quantitativa relativa tramite real-time PCR, non ancora identificati in questa specie, sono stati ottenuti e la loro importanza per l'ottenimento di risultati affidabili e robusti dimostrata in questa tesi. La modulazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati è confermata sia dall'analisi real-time PCR sia dall'analisi cDNA-AFLP, ma a questa non corrisponde un cambiamento significativo a livello del contenuto dei carboidrati, al contrario ad un aumento dell'espressione di alcuni TDFs coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi corrisponde un effettivo aumento del loro contenuto.

Quindi, si può affermare che lo studio presentato ha permesso di ottenere informazioni rilevanti riguardo il comportamento differenziato di varietà appartenenti alla specie *Beta vulgaris* e ai meccanismi fisiologici e molecolari che stanno alla base di questa risposta differenziata.

L'identificazione e il sequenziamento di 257 geni coinvolti nella risposta alle basse temperature pone le basi per la realizzazione di ulteriori esperimenti. Infatti, da un lato le sequenze ottenute dovranno essere in ogni caso validate da ulteriori saggi con la quantitativa relativa e all'interno del pool di sequenze sconosciute si dovrà lavorare per definire la loro funzione, ad esempio tramite *silencing*, strategia per la quale non esiste ancora applicazione in barbabietola da zucchero. Interessante sarebbe inoltre verificare se la modulazione differenziale verificata per i due genotipi in esame si rifletta anche nelle sottospecie selvatiche, ad esempio in *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, particolarmente adattata ad ambienti ad elevato potenziale osmotico.

Le sequenze collezionate, insieme ai circa 5000 TCs presenti sul BvGI, potrebbero inoltre trovare collocazione su un microarray *Beta*-specifico, che a sua volta potrebbe essere integrato da sequenze ottenute dalla frammentazione e pirosequenziamento, tramite approccio NGS (Next Generation Sequencing), dell'intero trascrittoma di *Beta vulgaris*.

## **ALLEGATO A**

### **SEQUENZE TDFs IDENTIFICATE**

>MA5FO1-1

CGTTCTGTCAATTCAACCCATGTAAATTTCTCTTACTTCCCATTCCCTCTGTTCTTCTTGGCTGCTCGAGG  
AACCACTTTTTCTTCAGTGCAGCAACGAGGTGAGTTCTCAATATCAGCCCGTGCAGCTCTCTTGCCTTTGT  
CCCTTGACTTGTGGGATCATTGCACCATCATCTATGATAGGGAAACCATTGTGTGTGGTGTTT

>MA5FO1-2

CAAAGCAAGACATACATGGAAGTGAAAGGAACCGGGACAGCTAACCAATGCCCAACCATTGAAGGTGGA  
GTTGATACATTTGCCTTCAAGGCAGGCAAATACAATGCCAAGAAGTTCTGTCTTGAGCCTACAAAATTTG  
CAGTGAAGGCTGAAGGAGTGAGCAAGAACGCGCCACCAGACTTCCAAAACACGAAGCTGATGACCCGT

>MA5FO2-1

CAATTTCTAGATCAACTTGAAGAGAAAGCTGATGTTTTATGTCATCTCCAATATGAAGAGTATGCTCACC  
CATTTGGATTCTTCTAATTCCAACTCATCAGCTGTACTAAGATGTTTGCAGACATGTATGTTTCATCCTGA  
CTCGTTCTAGCGAACCTGCTAGCACGTGGA

>MA5FO2-3

GACGAGGTATAAAACATCGTGATCCAAGGTAGTGCTGAAGTAGGAGCACGAGCGACTGAAGTCCATAA  
ATGAACTTAATGTCTGTTGCATTTTTCTTTCTTGACCTTTTTCTTCATAATCCCATTGCCTTCGTACAATCAC  
TGGCAAGCATTGAGGGGATTGAGAGATATGCTC

>MA5FO3-1

GCAAGCCTGGCCAGTTTGCATCGTGGCCGGTGACCGGTCCACAAGCTCTACTTTCTTTCAGATTCTTTAGG  
GTAATCTTGACTGGTCCAACCACTGATCCACAGAACTTGAAATTTTGCATATGCTTCCTTGAACCTTA  
TGGCTACTTCGCTAGTT

>MA5FO4-1

CAACATTCGGGCACGATCAAAATCATATAGAGGTTTCCCTTCATAGCACTGTGCAACCAAATCTCCCAGG  
GAATAAACAACTCCACTAATAACCATTTTTACAAATAAAGGATTGGTT

>MA5FO5-1

GCAATGAAAGTGGGTCCCCGATCTGATTGGGTGGGTTTGGCCCATATTAGGCGGCGACCCGACTCTCCT  
ATT

>MA5FO6-1

GCTACTTGGGGTGGAATTGATAAGCCTCGTGGTGCACGCAAATGAAGAATTATATTGGTT

>MA5FO6-3

GGTTTCTCAGGTTGAGACAGCTTGTCTAATTGTGAAATACATACAATTGTTGCTGGTTT

>MA5RA1-1

CGTTCTGTCAATTCAACCCATGTAAATTTCTCTTACTTCCCATTCCCTCTGTTCTTCTTGGCTGCTCGAGG  
AACCACTTTTTCTTCAGTGCAGCAACGAGGTGAGTTCTCAATATCAGCCCGTGCAGCTCTCTTGCCTTTGT  
CCCTTGACTTGTGGGATCATTGCACCATCATCTATGATAGGGAAACCATTGTGTGTGGTGTTT

>MA5RA2-1

GAGTCTGAGTAAAAACGAAGGATGAATCTTGACCGTCTGATGTAATTCCAGTAAGAAGACGCATGAGA  
AACTGATGTGATGGCGGACCATGGAACCACCACTCAAGATCAGAAGCAAGAAGTTTCGAAACCTCGTGA  
GCGTCACGTGAGGCTAAGGCTTCATAAAGGGCGAGTACCACCTGTTTGTGGTGGATTCTTCGCTCTTTGA  
TTTT

>MA5RA3-2

GAGCGGCGATTGAGGAGCGAAGCTGAGAAATGGTGGCGATATCGTGAAGATTGTAGATATCCATTACAG  
CAGGAAGTGATCTGCAAGCTGTTTTGAAGAAATCGAACATTCTTACGTGCTTCTTCCAAAGTCGCTGAA  
TTTGGGGGTACTTTTGTCTGCCACACCGCCGCCATT

>MA5RA5-1  
TCCATCAACAGCAAAGAGTAGTTTAGTCATTTGATCTGGTTTCATGTTTAGTGCTTTACTTCTAGCTCTCCA  
TACAAATGCTGAAAGTGCTTCGAAACTAGTACATTTGTTTAGGTTCCCGTCTTCCATTGCTTTAGCTT

>MA5RA5-3  
AAAAGCAGAGCTGTTTCAGAGAGCACCTCCCAATGCTCGCAAGAGAATAATAATAATCCAAGTCTTAGTCC  
TAGTCCAAGTCCAGGCCATCATTAGTGCAAGTCTTTGAGCGAGTTTGATGTCCGTCTCAATAATCTGT  
TG

>MA5RA5-3  
CAACAGATTATTGAGACGGACATCAAACCTCGCTCAAAGGACTTGCCTAAATGATGGGCCTGGACTTGGGA  
CTAGGACTAAGACTTGGATTATTATTATTCTCTTGCAGCATTGGGAGGTGCTCTCTGAACAGCTCTGCTT  
TT

>MA5RA6-1  
TGAGTGGAAGTGTGCACCCGCTTTTCAGGAAAGCTGTTTATTGTGGTCTAGGTCGGTAACTGATGAACAA  
TTGCAAACATCTGTAACAGAGAAGCAGTTTATTGTGGGGTAGGTA

>MA5RA6-2  
ATGAGAAGGCGGTGAAAATTCTTGAAACATATTGGTTAGAGGAAGAGGAAGAGACCGTACCATCAGGTG  
ATCAAGCTGGGTCCAGATGTGGAGCAATGAAGGTCCCTCTGGCG

>MA5RA7-1  
AAATGATGCTAGCTTCAGGGCAGGGTAGGGCTAGCTGGGTATGGTCAGAACTTTACCTTTTCCATAGGA  
AGTGCTGTAGTCCGACTCG

>MA5RA7-1  
CGAGTCCGACTACAGCACTTCCTATGGAAAAGGTAAAGTTCTGACCATAACCCAGCTAGCCCTACCCTGC  
CCTGAAGCTAGCATCATTT

>MA5RA8-1  
CAGCAGCTCGGTCAATGCCCTCTAAGGCATATTCTTTCATTTTACGCGTTTTCTCGAAAGCCAACTCGTCT  
ACCTGGACTT

>MA5RA8-3  
CAATCAGCTTCCCAAATCGACTGGAGTTGTCATTTCTCAAGGTCTTTGCATTGCCAAAA  
GCTTCCAAGATGGGATTAGTTT

>MA5RA9-1  
GCTTCCACTATAAAGATTTGCTGTCTTGACAGTAACTTTTGCCTGGCTCTT

>MA5RA10-1  
CGCTAAGCAGAATACAGACATGGCTGTTATGA

>MA5RA10-3  
AAAATGGGTCTTACTGTGTGTAGAACTTGGGC

>MA6G1-1  
TAGAGGCGAAACCAAGCCCTTCGCTTGACAACTGATCTAAGCTAGCTGCAGGCTGTGCTCTTGCAACCTT  
AGCAATGGCCTGGTTTTCTCTGGGGTTCCACTTTCAAGGAATGCTCCAACGACCTTCCCATCTTTTATCC  
AGTATGTACCAAACCTTGTGCGGCGATGATGCAGGGTCAATATCGCCAAAGATAACAGTCTCTC  
CCACATTATCCCATAAAATTGCCAGGATAGATCAAACGAACGAGAATAGAAGTATGGTAAGTAATCATA  
TTCCTCAATTGACTTCCCTTCCCTCGCTAGCTTTGATGGCCTTACAGCCTGCTCAGCAGATTTACGGGCATG  
ATCAACGTGTTCAACTCTTCTAATATCACCATAAATTTTCATTGGAAAGGTGGCAACATCACCAACAGCAT  
ACACATCTGGGACACTTGT

>MA6G1-2  
GATTTACCTTGGACTTAGCAGGATTGCAAATCTGTACCCATTCTTCTATGAAATCAGTAGAAGTGTTACC  
ATCATCAGGGATGGACATAAGCCCTTTATTCTCCACAGCAGCTGTGTCCAATCACAACGATATTCTCCA  
CCTTGAGAAACAAAACAGCATATTCAATAGCTGCTCCTGTGCCAGAAAATTTTGTCTTATCATAAGGTGG  
GACCATGTTGGCAATATTTCTGACTGAAAAGGCCTCTCCAGGTTGAAAATCAAGAATATGCGAAGGACAA

ACGCGGGAATCTGAGCAGGAAAATACAAGAACTTAGGACTTTGACCCTGCGCAAGTTCACCGTACAAA  
GCAGGATTCTTTTCGTATTTTCAGTT

>MA6G1-3 / MA6RA3  
GAAAAAACAGGGGAAAAAACAGGGGAAGTT

>MA6G1-4  
AACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCCTCAAGAAGAAATAAGGTTTATTTGCATCTATCACTGCTTTG  
GAGCATTGGTATTATGAAGGCTCGGTAGCAACATTTTGGAAACAATCTGATTTTCAGCGGTT

>MA6G1-5  
ACAGGGCAAAACAAAAACAGAAATGTCCAAAAAACTGAAAAGCAATTATCCTGGTGTCTTAGCACAAAC  
ATAATTCTGTT

>MA6G1-10  
TGAAGCCAAACCATCTAACCCCTTGGCACCAAGATTCATTATTTGACCCAGGCAATGGAGACAAACCCTTG  
TCGACTTTTGATGCCAGGTACAATGTTTTTCATCACGTAGACACTGTACAAAACCTTTCCATCTGTTGTAGA  
TTGGTAAAGTGTTTCTCAAACAGAATGGAACCGGAAATATATTCAACCAGGCCAGGAGTTGTAAGAAGA  
AGCTGTCTGTACGCTGACGATTGGCTTCTGTGTTATCTAAGCCAATAGATGCCAACCTTTCCACAAGT  
TGCATTAGATTCATCAATGGCAAGGATACCACGTCCAGGAGAGGCAATAGTTTTGGCGGTT

>MA6G1-15  
ACAGGGCAAAACAAAAACAGAAATGTCCAAAAAACTGAAAAGCAATTATCCTGGTGTCTTAGCACAAAC  
ATAATTCTGTT

>MA6G1-21  
CAGCTGCATAACGTCCCCACGGACGCTTTCGAACACCGCGGAAATGCGCTTCCTTGACATTAATGACTA  
CAAATATAGTAGGTTTTTTTTTAGCATCAACTTCATATAATTGTATGTAGTGTCTTTTAGGTT

>MA6G1-22  
GAGCAGGAAAATACAAGAACTTAGGACTTTGACCCTGCGCAAGTTCACCGTACAAAGCAGGATTCTTTT  
CGTATTTTTCAGTT

>MA6G1-23  
CAACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCCTCAAGAAGAAATAAGGTTTACTTGATCTATCAATGCTTA  
GGACCAGTGTACCATACTCGCCCCTCAGCAACACCAAATCCTGACTGACTCCACTCC

>MA6G1-24  
ACAGGGCAAAACAAAAACAGAAATGTCCAAAAAACTGAAAAGCAATTATCCTGGTGTCTTAGCACAAAC  
ATAATTCTGTT

>MA6G2-1  
GCAAGCCTGGCCAGTTTGCATCGTGGCCGGTGACCGGTCCACAAGCTCTACTTTCTTTCAGATTCTTTAGG  
GTAATCTTGACTGGTCCAACCACTGATCCCACAGAACTTGGAATTTTGCATATGCTTCCTTGAACCTTA  
TGGCTACTTCCGCTAGTT

>MA6G2-2  
GATGCAGCATCTTGCTTATTTTCCATGTAATTATCTTCGTTTATTGGTATACTCTTGTAAAAACCTAAGATGT  
AATATTTACGCGCTCTCTCTCCCTCTGCTGCCTGTACTGTT

>MA6G3-1  
CAGGGAATAAACAACCTCCACTAATAACCATTTTTACAAATAAAGGATTGGTT

>MA6G3-2  
CCTGTAGGCTGAAGTGCTCCAAGATCAATGAGATTTTTTCATCACCTTTGTTGCGTCTTTCTCATAAACAGC  
ATAAAACAATCCAGCAATCTCTCTCGCGTAAAAGTT

>MA6G3-3  
TCTGAGCTCAAGAATAACCTGGGGAAGGTTGACGGAAAAATAGAAGCCCTTCTCATAAAAAGGCTGGC  
CTCTTGCTCTCT

>MA6G3-4  
CAGGTTGCTGAATTTCTTCAGTTTCAGTGGCTTCTCCAGAAGAAGCAAGAACAACAACTTTGACGCAGC  
AACTTTATGGGAGAATTTGGAGGGAAAATTGTGAGAATATAAGCAAGTATTTGTAGTGTAGCATTTAGTT

>MA6G3-5  
CCTCTAGATGCTGCTCGAGCGGNCGCAGGGTGATGGATTTTGAAAAATAAACAAGGTAAAGTGTGTAGTG  
ATCTTGTGAAGTAAATAAGCTCCTGGGGAAGGTTGAGGGAAAGATAGAAGCCCTTCTTATAAAAAAGGCT  
AACCTCTTGTCTCGC

>MA6G3-6  
GCTGAAAGAATCCCACCCTGTAATTTTCTACTGTGAAACATCACTCACTTGTACCTTTAGGATAATCTG  
TTGTTTCTCGTTCTCGCCACGCACCACCCGTATTCCCTCTCCACTGTTGCCCGTACTATGGGTTCCGTTCT  
C

>MA6G3-7  
AACCGGTGCCAAGGTTACCAAGGCTGCCCTCAAGAAGAAATAAGGTTTATTTGCATCTATCACTGCTTTG  
GAGCATTGGTATTATGAAGGCTCGGTAGCAACATTTTGGAAACAATCTGATTTTCAGCGGTT

>MA6G4-2  
TCTGCAAGCCTGGCCAGTTTGCATCGTGGCCGGTGACCGGTCCACAAGCTCTACTTTCTTTCAGATTCTTT  
AGGGTAATCTTGACTGGTCCAACCACTGATCCACAGAACTTGGAAATTTTGCATATGCTTCCTTGAAC  
TTATGGCTACTTCCGCTAGTT

>MC5G1-1  
GCAGTATTGGATGGACGAGAATTATATTCGTACTTGTTCGCTCAATCCGGCGAGCTTG

>MC5G1-5  
ATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGTATATCTAAAAANCTCTC  
CCTTGAAAGGCTGAGTTCCTGATCAAAGGATTAACCTTTATGGGGAGTGAACAAAGNTAAAAAACAGGG  
CCCCT

>MC5G1-6  
GAAACATGCGTCGACAAAATCCCAGAGATCAAGTTCACAAATCTCTTCATCAATGGAGAATTTGTTGAGG  
CCACTTCTGGAAACACATTTGAAACAATTGATCCAAGAAATGGTGAAGTGATAGCAAGGCTTGCAGAAG  
GAGATAAGGAAGATGGTGATTTGGCTG

>MC5G1-8  
AACGGTAAAGAATCAACCATCACCGCGGTTGTTGTTGTTCGGTGAGAGATGAGACGGTTTCTCATGGCTTG  
ATGATTCCACGGTACTACTCTGACTGGGAATATTACGATTATTGGTAGCCGTTACTTGCCTGTCTGATCTC  
GGGACCAAGCTTGATGCATAGTTTGTGTTTT

>MC5-G1-10  
CAGGGATAACAAGAGTAGCATTGAGCAGCCGTGCTACTGCAACAGCATCGGAGATAGCATTTCGTGTG

>MC5-G1-11  
TCAAACACATAAACACATACCATACAGAGAAAACAAGAATCTGACAGGGACTGCTCGATATGCTAGTG

>MC5-G1-14  
CGGTGATCATAAACATTCCCGTAAGCGTGATGATGGGCTAAAGAGAAAACCTCGTATTGGTGGTTTCATAT  
TCATTTGATGCCTCACATGATCATTGTGCTGCTCGTG

>MC5-G1-15  
TGACAACTTGCGCATAATAAAAGCCCGGATTTCTCATCGATAAGTGCTTGGTGATTTTG

>MC5-G2-1  
TGCACCGGAATAAGTGGATCACCCAAGAAAGGTGGTCATGGTGGCAAGTTTACTTGGGCCGGTGATGGGC  
TTTTTGTGATCATGAAATTCCTGCTAAATCTGTTGTTGATG

>MC5-G2-3  
CCCCTGCATATTGCCGAGCAAGAGGATGTGAAGAAATTATTCTGCTACTTG

>MC5-G3-1  
CTCCTTCATGGGAGAAAACCATGTGCCAGGTTTCTCCAGGTGCATCATCCCCAGTGATTTTAGTG

>MC5-G3-2  
GCCAGCACAGGTTTTTGGCTATACAACAGCGATGCTACTCAACACATCTTTGAAGTATCGGCAGGTTTAGAT  
TCTTTGGTACTGGGAGAAGGTCAGATTCTTGCTCAAGTCAAACAGGTTG

>MC5-G3-3  
GCAGTATTGGATGGACGAGAATTATATTCGTA CTGTTTCGCTCAATCCGGCGAGCTTG

>MC5-G3-4  
GGGTGCGGCGACGGAACATGGGTGTTTGGTTG

>MC5-G3- 5  
GTAGGAGAGAATTAGAATACTATCAACAAGGACACCGTTGGCAAGTGCTGGGATTTCGCCCGTGTAGGCC  
GCGTAGTGTCTTTTGGTAGCCTCATCTATCCCTCAGCAATGTTTTTGGCATCATCAAGATTCTGCGAGACA  
TGG

>MC5-G3-7  
GACGACTTGGTGGCTCTAGTGGCTTTCCAGACTAATGCTCTTGCTGGGAAGAGAAGTACCCAGAACGGAG  
TAGTAGAGGCAAACTAAAGGTAGCAATCAATGGATTGGAAGGATTGGAAGAACTTCCTAAGGTGCT  
GGCACGGCAGGAAGGACTCTCCCTTGGAAAGTTGTTGTGATCAACGACAGTGGAGGTGTCAAACAAGCTTC  
CCACCTTCTCAAGTACGATTCCATCCTCGGCACATTCGATGCTGATG

>MC5-G3-8  
AACGGTAAAGAATCAACCATCACCGCGGTTGTTGTTGTCGGTGAGAGATGAGACGGTTTCTCATGGCTTG  
ATGATTCCACGGTACTACTCTGACTAGGACTACTACGATTATTATTATTG

>MC5-G3-13  
TGTCGCTGCGAATATTGTGAAAGGAGGTTTTTCTTACAGTGGCCAAAGATGCACAGCTG

>MC5-G3-16  
TGCCAAAAGAGGAAAAATTTTCAGGTTGATGAGGTAGAAATGGGGAAGAAAGGGGGGTGGTTTTCTGCT  
G

>MC5-G4-1  
TGCCAAAAGAGGAAAAATTTTCAGGTTGATGAGGTAGAAATGGGGAAGAAAGGGGGGTGGTTTTCTGCT  
G

>MC5-G4-2  
TGCACCGGAATAAGTGGATCACCCAAGAAAGGTGGTCATGGTGGCAAGTTTACTTGGGCCGGTGATGGGC  
TTTTTGTGATCATGAAATTCCTGCTAAATCTGTTGTTGATG

>MC5-G4-3  
TACGGATTCCAGAGCTTTCAGTCATCACAGCAGCTGAGTCAGATTGAGCTTTGAAGAACA CTGAAGCTTT  
CTCCTTG

>MC5-G4-5  
TCCAAATGCTATGACTGCTGCGGAGATTACTGATAAGCTTGGTCTCAACTCCCTTCGTCAGCGTCATTGGT  
ATATCCAGAGCACGTGCGCCACTTCTGGTGAAGGTCTCTACGAAGGACTGGACTGGCTGTCCAACAACAT  
TGCTAGCAAGGCTTAGATGGCAGGATATGCCCGGCTGAGCGTAGGATGAGAATATGTGTGGATTTTGCAG  
CACCTGTTCAAGTGGGAGATGATATTGAGCGTTTGGCATGTGTTTTTCTTTGTTGTG

>MC5-G4-6  
GGCAAGGTTGAACTCCAATACTTGCATGAGTATGCTGGCATCAGCACAAGCCTTGGTTTGACAGCAAACC  
CTATTG

>MC5-G4-8  
TAGGGGAAGGGGTGAGTGTAATGTGCCTGTCTCGCCATTTTGTCTG

>MC5-G4-10  
GATCCAGATTGAATATTGTTGGAGATGGTAGCGGAAATGGAACCTTG

>MC5-G4-11  
ATGTTACTGTTTTGAGTTGTTATTGGGGTACTGTTTACTGTTACTG

>MC6-G1-2  
ACCAGCCTTCAAGGGGGTCATATGATTTACACCACTTATGCTGATCTTCCTCCACAGGTGGCTGGGCTTAT  
TAGGCAAGAGAAGTCAGATAGCAGCACAACAGAAGATGAAGGAGAGAGCAGTAGCCTGGCCTCAAATTT  
GGGCAAGGTTGGTGCAGCAGCTGTGGTAGGTTGGGGCGTG

>MC6-G1-3  
AGGCTCAAAGCTTGTGGAACTAGCATAGATGTTTCATCGTTAGCTGTCCATACTTCCAGAAGTGTGATAT  
CAGAAGATTGGAGAATATGGTGTATTCCCAGTGAGAAATTTCCCTGTCTCTATCTGTTATAAATTTTTTCC  
CGGTGCAATAGCTGGTTGCAGGAAGTCAGTTGTGAATTTGGTG

>MC6-G1-4  
TGTGATGCTGTGGTGCTGAAACTGTATAACCTCTTGCTGAAGGAAGTGCAGTGAGAGCGACCTATGGTAT  
GAGCTCCAGATAGAATAACCATCTCTTCTTGTTG

>MC6-G1-6  
TCATGTAGCTGTGGGTCAGATATTCAAAGTGAACCTAAAGGGCCACTCAGAGAAGAAATTGAGATTCTCT  
GTTCAATGGCATGTTGAGGATGCTCCTATGGCCTTTTCTGATTTCGACGCCCTCAAGCTCTCAGGTTCTGTTT  
GCATAGCTTGTGCTTGTGGTTTCTTTTGTCCATCTTG

>MC6-G1-8  
CCCTGTCTTTGCTCCTGACAATGTTGCCAGTGCACCAGTTGATGTTACGAATGACCCTTTTTTCATATTTGAT  
TGCTTGCTCATAACAATTCAGCAGGAGAAAGATTGTAGAGGACATGAGTAAATTTGAGAGCGCTATCACTA  
ACGCTAATGGTAGGAACAACCGGGTGGTGTGATGATGGACGTG

>MC6-G1-11  
CCTCCAAAGCATGCAGTTGAAGAAGGTGAGTAAGTATGGAGTTGCTGAGTATTGTTCTACTGATCCCTTCT  
TGCATATCCGCATAAATGTTGGCATGGGTGATAAGTAGAGGGAGAAAGAGATGATATCCCTAGAATACC  
GACGGCGAATCGAGCAACAGCTGGAGAAACCATGGCTATGGTG

>MC6-G2-1  
TAAGGACATCGATTACTCGTCAGGTGATGTTTGTGGTGTCTGGTTCAGTATCCTGGTACTGAGGGAGAAG  
TTTTGGACTATGGAGAGTTCATAAAGAAGGCACATGCTAGTGGTG

>MC6-G2-2  
TGAGAAGCCAGTGGATCGGTACCCGATCAGCAGTTCATGGAGAACAAGAATGGCACAGTGAAGTACTGAT  
TTGAAGTTGCGTG

>MC6-G2-3  
GAACCTCAAGCTCAATCTCGCTCGCACACCGTCAAGTTGCCGTCCTAAACCTTCCCTCCTTCAGCCTCGTG  
TTGTCGTCTTTGACGGTGTCTGTCTCTGTCTCATAACCGGTG

>MC6-G3-1  
TTGCTTTGAGAAGTTCGGTGACCGTG

>MC6-G3-2  
TAAGGACATCGATTACTCGTCAGGTGATGTTTGTGGTGTCTGGTTCAGTATCCTGGTACTGAGGGAGAAG  
TTTTGGACTATGGAGAGTTCATAAAGAAGGCACATGCTAGTGGTG

>MC6G3-5  
GCTCCATAATCGGATTTTATACTCGTAAATCATCGTCTATGCTACGAGTATGGCCTCGAGATGAAGCCATA  
ACCATGCAATAGAACTTTACTAGTTTACTCTAAGCTTGTACTTACAGGAGTAAACTCGTG

>MC6-G4-1  
GAAGACAGCTGATGTTGTTGGTGTTCAAATTGCTTCTGCTTTACTAGCTGAAATAGAGCAGGGGGGAGTA  
GTGGATTCAACACATCAGGGCTTATTGTATGTTCTTTGTGCTCTGTGTCCACAAGATGTTTCGAAAATCCG  
TGTGGGGAACTTTCTCCCTATGGAATAGAAGTGTGAGGCTCATAAAGACTTTCTGGGTG

>MC6-G4-2  
GAACCTCAAGCTCAATCTCGCTCGCACGCCGTGAGTTGCCGTCCTAAACCCTCCCTCCTTCAGCCTCGTG  
TTGTCGTCTTTGACGGCGTCTGTCTCTGTGCATACCGGTG

>MC6-G4-3  
TAAGGACATCGATTACTCGTCAGGTGATGTTTGTGGTGTCTGGTTCAGTATCCTGGTACTGAGGGAGAAG  
TTTTGGACTATGGAGAGTTCATAAAGAAGGCACATGCTAGTGGTG

>MC6-G4-4  
TGAGAAGCCAGTGGATCGGTCACCCGATCAGCAGTTCATGGAGAACAAAGAATGGCACAGTACTGAT  
TTGAAGTTGCGTG

>MC6-G4-5  
CAGCTGACCCAGAAACCTTTGCCAAGAACCGTGAGCTTGAGGTGATCCATTGCAGATGGGCCATGTTGGG  
CGCATTAGGTTGTGTATTCCCAGAGTTGTTGGCCCGCAACGGTG

>MC6-G4-12  
GCGGAAACCATTTTTGCATACAGGAAGTTGGTATAGAATGGGTTCCAGACAATCAAGTTTGATGGGTTCT  
TCTCAAGTTATTTCGAGAAAGCTCCATCTCTGTCCTTGCTTGTGTTCTTATTGTTGCTCTTGGTCCTATT  
TTGGTTTTACTGTATGTCTTTTTCTTTTTGTGTGTGTTTGTGTGTGTTGGTG

>MC6-G4-16  
GCGAAATATGTGGAGAGACAGCAAATAATGTAAGAGGTGTGGGGAATGAGAGCTTTATGGAGGAGTGGA  
AAGATAGCAGAATGACTGCCAATGCAACCGATGCATCAGACAGAAGTGCAGAAGGATGCTGGCATGGG  
AACCATTTGTAACTTCCTCATGGCTTGCTTAGTGATCGCGTTTGTCTTACCATGGTTTTCCGTG

>MC7G1-2  
GTACGAAGAACAAGGGGCGCCAAAATCCTTGAGATGAAGTTCACAAATCTTTCATCAATGGAGAATTTG  
TTGAGGCCACTTCTGAAACACATTTGAAACAATTGATCCAAGAAATGGTGAAGTGATAGCAAGGCTTGC  
AGAAGGAGATAAGGAAGATGTTGATTTGGCTG

>MC7G1-3  
GCCCCGGCCCTTCGTAGGATGGGTTGTCAACTATGTTTTTCAGGTTGTTGCCACGAATTTGAACAGCTTC  
TCGAAAACAGTCGTCGTTTCTTGCTCGTCTAGGGTCTCATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT  
TAGAAATGGATTGCAAGCTGCTG

>MC7G2-1  
TCCCAAAAAGATGGTTATGTTTTCTGGGATGATTCTTTTTCACTAGAGTGCAGTGGAAACAGAAGATTCAAT  
CCTTCATCTGAAAGAAGAAAGCGTTTTTTTTCAAGTTTCAATGGCAAATCACCAAAAATTTCTAGGGAAG  
GTTGGCGGTTTCGCACTTTATTGCACCGGCTAAAATGCCTGGAAAAAAGGGGTTAATGCCCAAAAAGGG  
ATTTCCAAAAGGGGTTTTTATAACGG

>MC7G2-2  
TGCCAAAAGAGGAAAAATTTTCAGGTTGATGAGGTAGAAATGGGGAAGAAAGGGGGGTGGTTTTCTGCT  
G

>MC7G3-2  
GCTAAGAAATCCCACTCAAAGCTTCAACCTCGAGAATCTG

>MC7G3-3  
CTCCTTCATGGGAGAAAACCATGTGCCAGGTTTCTCCAGGTGCATCATCCCCAGTGATTTTAGTG

>MC7G3-5  
TGTCGCTGCGAATATTGTGAAAGGAGGTTTTTCTTACAGTGGCCAAAGATGCACAGCTG

>MC7G3-6  
TAAGGACATCGATTACTCGTCAGGTGATGTTTGTGGTGTCTGGTTCAGTATCCTGGTACTGAGGGAGAAG  
TTTTGGACTATGGAGAGTTCATAAAGAAGGCACATGCTAGTGGTG

>MC7G3-8  
AATGAGGGTAATCAGGTGTGCCATGATCAAACACAAGCTG

>MC7G3-9  
ATGAAGCTCTTGAACCTTCGTGATGGTGATAAGTCTGTTTATGGTGGTAAAGGTGTTCTTCAAGCTG

>MC7G3-11  
CAGATTCTCGAGGTTGAAGCTTTGAGTGGGATTTCTTAGTTATCACTACGCAGTC

>MC7G3-15  
TCGTCTCTTGGATTGACTGGAAACAAGGTGGAGAAGCTCTGTGATCTCTGCAACATCACTG

>MC7G4-1  
TGCCAAAAGAGGAAAAATTTTCAGGTTGATGAGGTAGAAATGGGGAAGAAAGGGGGGTGGTTTTCTGCT  
G

>MC7G4-2  
ATGTTACTGTTTTTGAGTTGTTATTGGGGTACTGTTTACTGTTACTG

>MC7G4-3  
AGTCCTGGTGACCATCCCGAAGATGTGAAAGCAAGGCTAAAATTTTGGGCTCAGGCTGTGGCGTGCCTG

>MC7G4-5  
CTGATAAGGTAACAACCTGGTCCAGAGCTGTTTTCTCTGCTGAGTTGTGACTGCCATTATCATCTTCTCA  
CTGCCTTTATCCTATCATCTGAAGCAAAGAACATGTGCTCAGTCCGGCATAGTCCAATCCCTTCGGCACCA  
TTATTTCTAGCTG

>MC7G4-6  
TAGGGGAAGGGGTGAGTGTAATGTGCCTGTCTCGCCATTTGTTTCTG

>MC7G4-7  
CTAGTCCTGGTGACCATCCCGAAGATGTGAAAGCAAGGCTAAAATTTTGGGCTCAGGCTGTGGCGTGCAC  
TG

>MC7G4-11  
GAAACATGCGTCGACAAAATTCCAGAGATCAAGTTCACAAATCTCTTCATCAATGGAGAATTTGTTGAGG  
CCACTTCTGGAAACACATTTGAAACAATTGATCCAAGAAATGGTGAAGTGATAGCAAGGCTTGCAGAAG  
GAGATAAGGAAGATGTTGATTTGGCTG

>MC7G4-13  
TCCTAGAATTCAGAAGAAGAAGAAGGATAAATGCGAATTTCAATTCTCCGACCTAGCTCGCCTCGCTAAG  
GAATCTCGATTCACTG

>MC7G4-20  
TGCACCGGAATAAGTGGATCACCCAAGAAAGGTGGTCATGGTGGCAAGTTTACTTGGGCCGGTGATGGGC  
TTTTTGTGATCATGAAATTCCTGCTAAATCTGTTGTTGATG

>MC7G4-21  
GATGAGTCTGAGTTCAGCAGAAAGCACATCCCAGTCTTCCCCATTTCTGCTTTCATTATGAAAATTGCATC  
CCAAACCAAGATCTTCTGTTGTCT

>MC8G1-1  
TGTGCTGCTGTGGTGCTGAAACTGTATAACCTCTTGCTGAAGGAAGTGCAGTGAGAGCGACCTATGGTAT  
GAGCTCCAGATAGAATAACCATCTTCTTGTG

>MC8G1-2  
TGCACCGGAATAAGTGGATCACCCAAGAAAGGTGGTCATGGTGGCAAGTTTACTTGGGCCGGTGATGGGC  
TTTTTGTGATCATGAAATTCCTGCTAAATCTGTTGTTGATG

>MC8G1-6  
CCTCAGCACGGACAGAATTCCTTGATCCTCCTCTAAAGATGCCCAAGTCATCCATGTCACATAGCTTTGC  
GAATTGATG

>MC8G1-7  
AATAAGTGTGATATGACCACCCATTGCCAGGCCAAGGGTGACAGCAGGGTTCAAGTGTCCACCGGAGAT  
G

>MC8G1-13  
ATAACATTGATCATGCAATTCCTGCTATATCTGTTGTTGATG

>MC8G1-14  
AAGTGCCTTACCAACTTTTACGGAATGGACCTTACTACCGACAACTCAGATCATTGGTTAGAAAAGTGGC  
AATCTTTGATTGAAGCTCATGTTGATG

>MC8G1-16  
CATCTCCGGGGAACTTGTAGGATGCTGAACCTTGTACTTTGTTATCATAGTTCTTTTTTGTGCGCTAATAT  
GGTTTGTGATTTTCATGTTATCACTGAGATAGAGATGTTTGATAATCCTGATACTCAGTTTGCAATGTTTTAC  
GTTTTTTTATAATG

>MC8G2-1  
GACAAGGAAGCCTAGGGTGATAGTAAACCTTGTTATTTTTGTTAGCATAGTATCTTTTTTGCAGCTAATATG  
GTTTGTGATTTTCATGTTATCACTGAGATAGAGATGTTTGATAATCCTGATACTCAGTTTGTAATGTTTTACG  
TTTTTTTATATG

>MC8G2-2  
GAGACCCACGGAAGGGTGTCCGAGTCTGGCTCGGTACCTTCAACTCGCCCGAAGAAGCGGCCCGTGCTTA  
CGACACGGCCGCAAAGAAGATACGCGGGGAGAAAGCCAAGCTCAACTTCCCTGACTCTCCGCCTCAACC  
ACCACCGGAATCACCACCTTGATGAGCTTTCTCCTCGTTCAGCGAAGCGCCCATGCATGTCATATTCTACTG  
AGTCAACTCAGCTGGCTATGCCTACCATGAGCATGAGAAGCTGGGGTAGTGATGATAATG

>MC8G2-3  
TGCCCGAATGCATGGCCCTGGTAGATATGGAGGGAGAGAAGTGGGTTGAAAATGCACTTTGCAGGCTTCT  
GAACTGTACCATAACAATATAGCTCTTTGCTATAACAGTTTTATGCAATGTACAGAGCATCAGGATTTATACT  
TTGCAGCGTCACAGATGTTGTCACCTGTTAGCCATATAACTACACAGTTCCACATTCATGTTCAATTTTTGT  
GTATGGCATAACATTTAGTAAGAATTCGGAAATTACGGAAAATGTGTTATTGAATG

>MC8G2-4  
TCCAAATGCTATGACTGCTGCGGAGATTACTGATAAGCTTGGTCTCAACTCCCTTCGTCAGCGTCATTGGT  
ATATCCAGAGCACGTGCGCCACTTCTGGTGAAGGTCTCTACGAAGGACTGGACTGGCTGTCCAACAACAT  
TGCTAGCAAGGCTTAGATGGCAGGATATGCCCGCTGAGCGTAGGATGAGAATATGTGTGGATTTTGCAG  
CACCTGTTCAAGTGGGAGATGATATTGAGCGTTTGGCATGTGTTTTTCTTTGTTGTG

>MC8G2-6  
GAGAGAGAAAAAGAGAGGCGGCAGACAGAGAAGATGAAGAAGATTTGGCGGTGGGGGGGAGAAATGGT  
GGTCTGACTTCAACCTGCGAAAATGTGAAAATGTGATACTATGCAATAATGTTTTTCTATG

>MC8G2-7  
AGTGGTGCTGAGGAAAGAGAGATATTAGAGGTTTCTCAAGTAGATAGAATTGAAGAACAAAAGGAGGAT  
GCAACAAATGGAAAAGTTGGAAATCCATCTCCAGTCAACATAGCAGTAGCTGTTGCTAGTAAAAATCTGC  
TGAAGGAAGTAGAAAATG

>MC8G3-1  
TCGTCAAGACTCTTACTGGCAAGACAATCACCCTTGAAGTCGAAAGTTCCGATACTATCGACAACGTCAA  
GGCAAAAATTCAAGACAAGGAAGGCATTCCACCAGACCAGCAAAGGCTGATCTTCGCTGGAAAGCAGCT  
CGAAGACGGGCGAACCCCTCGCCGATTACAATATCCAGAAGGAGTCAACTCTCCACCTTGTGCTCCGTCTT  
AGGGGTGGTATGCAAATCTTTGTGAAGACTCTCACCGGAAGACGATTACTTTGGAAGTTGAAAGCTCGG  
ATACGATTGACAATG

>MC8G3-3  
TCGTTGCGCTCCGGTGAGAACTACAACATG

>MC8G3-4  
TCCCTTGTGCGCCATTGTCACAATGAGGCCACTAGCATGCTGCGCAACCCAATGGATCGGCATGAACTAAA  
TCGATGTGATG

>MC8G3-6  
TGCCAAAAGAGGAAAAATTTTCAGGTTGATGAGGTAGAAATGGGGAAGAAAGGGGGGTGGTTTTCTGCT  
G

>MC8G3-7  
GAATCCAGGTCAACAATTCCTTTTGCTCGCCTCTTCTTCCAATG

>MC8G3-9  
CATCAATTCGCAAAGCTATGTGACATGGATGACTTGGGCATCTTTAGAGGAGGATCAAGGGAATTCTGTC  
CGTGTGACGAGATTACTACGCATTCTTCCTGGCTAAGTTCAGTACCAATGGTGGCGCTTTTGCTGGGTTT  
T

>MC8G3-10  
GCTGAAAGAATTCACACCTTGTAATTTTCTACTATGAATCAGCAGTTCATTAGTGGCCTTTAATTTGTACA  
TCTTGGTCCAAGAACAAAAACCTACATTTTGCAAGGCTCACCATG

>MC8G3-12  
CCTCAGCACGGACAGAATTCCTTGATCCTCCTCTAAAGATGCCCAAGTCATCCATGTCACATAGCTTTGC  
GAATTGATG

>MC8G3-14  
GACGACTTGGTGGCTCTAGTGGCTTTCCAGACTAATGCTCTTGCTGGGAAGAGAAGTACCCAGAACGGAG  
TAGTAGAGGCAAACTAAAGGTAGCAATCAATGGATTGGAAGGATTGGAAGAACTTCCTAAGGTGCT  
GGCACGGCAGGAAGGACTCTCCCTTGGAAGTTGTTGTGATCAACGACAGTGGAGGTGTCAAACAAGCTTC  
CCACCTTCTCAAGTACGATTCCATCCGGCACATTCGATGCTGATG

>MC8G3-16  
TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGG  
TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
CCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCG  
GTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGA  
GCGGTATCAGCTCACTCA

>MC8G3-18  
CACAGCGTATGCTCTCTGCTGTTACTGACTGGTCTAATG

>MC8G3-22  
TTGTTCAAGTGTGTTTGAACCTTTTAGACCTGTAAGTCTGTTCTGTGATGGCAGCCCGGAAGTATGTATG  
CAAGGCAGTG

>MC8G3-25  
ACCGGTTATGACAACGCAGTTGCGTTGCCAGCCGGAGGAAGAGGAGACGAGGAGGAGCTGCAGAAGGA  
AAATG

>MC8G3-28  
CTCCTTCATGGGAGAAAACCATGTGCCAGGTTTCTCCAGGTGCATCATCCCCAGTGATTTTAGTG

>MC8G3-32  
CCTTATTTTGTGAGTGATGTGACGGCCTTTATAGTGGTCCACCAAGTGACCCCAATCTAAACTTATCC  
ACACATATG

>MC8G4-1  
ATGTTACTGTTTTGAGTTGTTATTGGGGTACTGTTTACTGTTACTG

>MC8G4-2  
TGCACCGGAATAAGTGGATCACCCAAGAAAGGTGGTCATGGTGGCAAGTTTACTTGGGCCGGTGATGGGC  
TTTTTGTGATCATGAAATTCCTGCTAAATCTGTTGTTGATG

>MC8G4-4  
TCACCGGAGTCTCTTGTCCACGACCCCATCGTGGGTCCCTCAAATG

>MC8G4-5

CCTTTGGCTCTGAAGACATAAAAGCAGAAAGTCTGATACACTGTTTATGTTTCGGTGGGGTATATTGCGCGG  
TGAACCTTTTCAAATGCAAGAGAGGTATTTACTCTTTGAACTCGAGCTTTCCAGCTGCTTCAATGGATTATG  
TCGCGATGATTTGTG

>MC13FO2-1

GGATATGGTCTCGGGGCTAGAGCTAGTGCAAGAAGAGGAGACAGAGGAAGAGGCCGAGATAGAGTTAG  
ATACAGAAGCTGTTTTTGTGGATGAACCCACGGTTGGTAACTTGTTCAGAGACCGAGTTTTTCAAAGCTGA  
AGAAGATGATTATGATGAGAAGAAAGATGAAGAAACGAAGAATACTGAATCCCTGGACTTGAGTGCTAT  
GAAGCTATCTGACTTGAGAGCGATTGCAAAAGCTCGAGGCATGAAAGGTTACTCGAAGTTGAAGAAGTC  
GGAGCTTGTGGGCTGCTCAGTGATGATTCCATGTAATCCTTGGTGAGGAACTAACTACCTGTACTCATC  
TAGAGATCAGTGAGATTTCTCCTTTTCGGCGGTTACTCAGGACTCATC

>MC13FO2-2

GGCGCACTGTGATGTTGATGACGGAAAGGTGGTGGTGGTTCATGGACTGAAACAGATTTTCAGAACTGGT  
GATGCACCGTGGTGGGCTTAATGTTGAATGTCTTCTAATCTCTTCAGGTGTCTTTCCCTTGATCATGTCAG  
CAACAGTTTGGCAAGTCAAGTCCAGCAAACCTCTTGATATTCAGGTAGTTGGCAGCAAGGATGAGATCGAA  
GAGGGTAGCCTGGTCAACTTTAAGAGAGTACAACCTTGCTGACAAGTACTTGAACGAGGCTGCTCTTGGAG  
ATGCTAACAAAGATTCCATTGACAGCGG

>MC13 FO3-3

GTATTGATCGCTTTGAACCAAGAAAAAATTTTCAGCTGTCTACTTATGCTCTGTTTTGGATAAGGCATGCC  
ATCATTGTTCAATGACTGTTTTCAAGCTTTACTCGTGTGCCCTTGGTCTTGAATCGGTCAGGGTGGAAAT  
TCAAAGAGCCAACTTGAATTGATGTTTGAATTAAGGTGGAGAACATTGTTGTGATCGGACACAGTGCTT  
GTGGTGAATCAAGGGGCTTATGTCTTTCCAGATGAAGGACCAACCACAACCTGACTTCATTGAAGATTG  
GGTTACC

>MC13 FO3-5

ATGCAGGCTTTGCTGCAAAGAGGAATTTTGCAGAGGTAATCGCAAAGGGTGAAGCACAAGGAATGGTGA  
GCAAGTCAGCCGGTATCATGCTTGGGATAGCATTAGCTAATTGCATAGGCTCCTCAGTACCCTTGCCCTC  
GCTTGCTTTGGTGTGATAACTTGGGTCCACATGTTCTGCAATCCGAAGTCTTATCAATCCATTCAACTGAG  
GACTTTGAACCCCTATCGAGCTTGGTGTTCAGTGAATATCTGCTGAGTGGTCAGGTGCCTTCGGTTAC

>MC13FO6-13

ACAATGCTCTTGGCTGCCTGCCTAGCAATGTAAGCACCCTCCTGTCAACCTTGGTTGGGTCCTTTCCGGA  
GAAGGCACCACCACCGTGAGCACCCCAACCTCCGTAGGTGTGATGATGATCTTACGACCCGTAAGACCA  
GCATCACCGTGAGGTCCACCAATGACGAAACGGCCAGATCGGTTACTCCATA

>MC13 FO8-4

TATGTAAAGAGCATAACAACATCCGACATCAATGTTAATTCTAAAATTCGCTATGAATATTATCAAAACCA  
ATCCAATTACACTTGTACATCAATGAAACAACATCAGTTTTATGTAGCGAATATTCATATCCGGTTACTCA  
GGA

>MC13 FO8-5

ATGAAACCATAGAATTGGTTTTGTAAAAGCACTGGTAGGTCGAAATGGAACAAAGTGATGATGGGAGTA  
ATTCCATTTGCGATCAATTCATCTATGAATTTGTTATAAAAATCAATGCCCTCTTGGTT

>MC13 FO11-2

GCCATTACGACACGAAATAGACAAGATAGGCATAGCTCCTGATGTTTCAGTGTACCACGGATGTGCTAAAT  
GCACCTAAGGCTTCTATGGTTACTCAGGA

>MC13 FO11-7

TCTATGAAGTTGAGTCTCGAGATTATAAACAATCACCCCAGATCGGTGACTTACAGTTCTCACATTCTGAG  
AGGAGGCTTGGTGCGACGGTTACTCAGGA

>MC13 FO13-2

ACAGTTACAAGCCAATCCTGTGTTCCATGATTCTCTCAATTGAATCTTGTAGAGGCAAGGGTGTCTTATGG  
CTTTATAGTATTGTGCATGTGTGATGCTCCCCTTCGTATCGGCGGTTACTCAG

>MC13 FO13-4

GAGCACAGTTACAAGCCAATCCTGTGTTCCATGATTCTCTCAATTGAATCTTGTAGAGGCAAGTGTGCTTT  
ATGGCTTTATAGTATTGTGCATGTGTGATGTTCTCCTTCGAATCGGCGGTTACTCAG

>MC13 RA1-3  
CAGAACGACCTGCCAAGGAGGCAGCCAATTTCACTGCTCAGGTGATCATCATGAACCACCCTGGACAGA  
TTGAAATGGTTACGCCCCAGTGCTCGATTGCCACACCTCCCACATTGCTGTCAAGTTTGCTGAGCTCGTG  
ACCAAGATTGACAGACGTTTCAGGTAAGGAGATTGAGAAGGAGCCCAAGTTCTTGAAGAATGGTGATGCT  
GGTATGGTTACTAGGACTCATCA

>MC13 RA2-4  
TTTGATGTATTTTTATGTAACTTTTTTAAGCGGCTTGTGACTTCTTAGATTTGCTGGTAGCCAATTGTGATT  
CAGGCTCCTTCCTAACTGATTCTTCCTTCTCAGACAAAGTCAACTCAATGTGGCAGGGATGGGACATGTAG  
GGGTTGATTTCGCCCATGAGCACGGTAAGTACGACGCCTTTGTTTCTGGGCTTGGTTACTCA

>MC13 RA2-8  
GAAAACATCCTGATATTCCCCGTGCACCGCCTGCTCGACCACGTGAAGTGGTTAAGCCAAATATCTCTA  
GTATGGTAGGCAGCCTTTATCCTAAACAGGAAAAAAGCAAATTAGATTGAGCTTTCACTATCTTTTACATG  
GGTATTAATTTTTGTGACTAATGTTCCCTGAGAACGTCTTTCAACCTCTAAAAATGTCGGTTACTC

>MC13 RA2-10  
GAGATAGCTGCTACTAAATTGCTATTGTCATCTTACTTTGACATTGTGAGGAAAATCATTGAGGATTCAGT  
GCCCAAGGCTATCATGCACCTTCTGGTCAACCATACAAACGTCAGTTGCACAATGTTCTAATTCAAAAA  
CTATACAGAGAAAAGCTGTTTGAGGAGATGCTTCAGGAACCTGGAGAAGTGG

>MC13 RA3A-3  
CCGGTACTCAGGACTCATCAGAAGTATTTGCTGCTTGTGTCTACGAACTTTGGAACTTAGATATGATG  
CGTACTCAGGACTCATCAGTCCCCGCCTCCGTAAGTGTCAATGATGATCTTACGACCATT

>MC13 RA3A-5  
GGCTGCCTGCCTAGCAATGTAAGCACCCTCTGTCAACCTTGGTTGGGTCCTTTCCGGAGAAGGCACCA  
CCACCGTGAGCACCCCAACCTCCGTAGGTGTCAATGATGATCTTACGACCAGTAAGACCAGCATCACCGT  
GAGGTCCACCAATGACGAAACGGCCAGATCGGTTACTCAGGACTCATCAAGGG

>MC13 RA4-1  
TTTCTCCNNTGAATACCTCCCCATGAAGCGGTGAAGTATTTGCTGCTTGTGTGCGACGAACTTTGGAAAC  
TTAGATATGATGCGGTTACTCAG

>MC13 RA5-3  
CTGGTGGGCATCTGATTGTGTATGATACTGAAGTATGTGAATCCATTTTAAACAACAACCTATTACCTTCT  
TCGTGGCTGCCATTCTTGCCATTGTTGCGGCGGTTACTCAGGA

>MC13 RA5-8  
TGATACCTCCCCGTGTGGGGTGAACCTTTTGTGCTTGTGTATTTAACTTTGCAAACCTTACATTCTTGCTG  
TTACTCATTCTTCATCATGTTGCGGCGGTTACTCAGGA

>MC13 RA7-1  
TCTCAACTTACCTCCGAACCTTTCCGCATCGGTCAGTATGTTGATATCACGGTTACTCAGGACTCATCATT  
CTCAGGACTCATCATGTTGCGGCGGTTACTCAGGACTCATCANCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGTTTG  
AGTA

>MC14G1-1  
AAGTTGATGAAGCAGGATGGAGTAAGAAACGGAAGGCCCGGCGAAACCGAGGGAAAACCTCTACGACGA  
TATCCGGTAGTTTCAGTGATGAGCTCTTGAATTGCCGTCACAAATAGCG

>MC14G1-2  
AGGCAGGCTGCTGAACATGAAGGATAGTGAAATTGAAGAAAACTGGATGCATCCCACGACGTAAGTCG  
CCACTGGGACAGCGAAACTGGTGCTGCTGCTGCTGCTCGAATCGAAGGCG

>MC14G1-3  
TGTGAAGCTAAAGAAGAAGCTGGGGAAGGTTGAGGGAAAGATAGAAGCCCTTCTTATAAAAAAGGCTAA  
CCTCTTGTCTCTCG

>MC14G1-6  
TCAGATTAGCAACTGAAAAACAACAACAATTCCTGGAAGAACCAAAAAACTGATTCTGATTCAATCT  
CCCTCCTTTTGCATCCTCTACTTTTCGCTGTAATGGTCTGCTTGGC

>MC14G1-7  
CGAGGAGGCTTGAAAGACCAGGGACTGGGTTGTGGCTTTGAAAGCG

>MC14G1-8  
TGAAGAAGGAGCTAAAAAGTCGCCGAAATTTCCGCCGAGAAAGCG

>MC14G1-9  
AAAAGGAGGGCGCATCATCTCACTGATAAGGTCATCGGTCAGTTCGGGCAGGGCAGCTCGGAGTTTGGG  
GACAGTTTCGGGCG

>MC14G1-13  
AATCAGCTGCAAGATTTCTGCGTTGCGATAGATGACCCAAATAATGCATTGTTTGTGAATGGGAGGTTCT  
GTAAGAATCCAATGGCCGTCAAAGTCGAGGATTTCCATTTTCAAGGGCTAGATAGGCCAGGAAACACACA  
GAACCAGGTAGGCTCTAGTGTGACACGAGTGACGACAGACAACCTTCCCAGGCTCAACACCCTTGGCATA  
TCATTGGCTAGGATCGATGTTGCACCTTACGGCG

>MC14G1-16  
GAGTGCGGCATGTCAAGCCTTTACTACTACTATGTCACAATCAGATATAGCTACAGAGAAAGAATACGCA  
GTAGCTGCAAATGATAAGGAAGCGAAGAAAGGGGTGCTGTTTATGTGATGATGCCGTTGGATAGTGTA  
AGATGGATAATACTATAAATCGGAGGAAGGCGATGAATGCGAGTTTGCAGGCG

>MC14G2-1  
GCTGTAGGATTCTCGATTGCCACAATCCTACTGTCTTCATGGGCG

>MC14G2-2  
CCAGTCTTCAATATGAACTGGAATGTTATCGGAATTCATCATGCAACCCGAGGTGTTGGTGTATCAACAA  
GTTCTTGGGAACCAAGTGCG

>MC14G2-5  
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
ACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC  
TGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGT  
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGA  
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC  
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA  
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC  
AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG  
GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA  
AATTAATAAATGAAGTTTTAGCACGTGTCAGTCTCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTGCCGGCCG  
GGTTCGCGCAGGGCGAACTCCC GCCCCACGGCTGCTCGCCGATCTCGGTCATGGCCGGCCCGGAGCGTCC  
CGAAGTTCGTGACACGACTCCGACCACTCGGCGTACGCTCGTCCAGGCTGCGCACTCACATC

>MC14G2-7  
CAACAGTAACACATGGGAATCTTGCTCCG

>MC14G2-8  
CCTGGAATAATCCAGATAAAGAAGATTGGTTGGAATATTCTGCTGAACTTTGTGGAGGAACCCACATATCT  
AATACAAGAGAAGCTAAGGGATTTGCTCTTTTATCTGAGGAGGGAATTGCCAAAGGAATTCGCAGAGTGA  
CAGCTGTTACATCTGACTGTGCTTTGGAAGCGGTGGAAGTGGCATCTTCCCTCAAGCAGGAAGTGGAAACA  
TGCG

>MC14G2-12  
CGACGGGCTTACGGCGGCTGGGTTTGGGCGCG

>MC14G3-1

GAGGCAAAAAGATTTATTAGGTGATGATTGGGTGCAAAGGCATAGAAGAGTTGTTTCAGCAGCATGCAAAT  
CAATATAAAAAGGATTGCATGGGCTAAGATTCTGCAATCTCTCTCCACACAGGGCTTGACCTCTTCTGGAG  
GAGGCGGAAGTGGAGTTGCAGTTGATGGGGGAAATAGTAGTGGAGTATCAAGAGCG

MC14G3-2

GCATCATTGACATATTCTTCATTATCTATCATTTACCTTCAGCTTCCACAATCTCTTTACATTTTGCAATA  
AGTTGTTCAACAGTTTCTCTGATGATCTCAACTGCTTTCTCGGCTTTTATTTGTCTCGGAATAACTTTACAC  
AAGGCG

>MC14G3-3

AGGCAGGCTGCTGAACATGAAGGATAGTGAAATTGAAGAAAACTGGATGCATCCCACGACGTAAGTCG  
CCTACTGGGACAGCGAACTGGTGCTGCTGCTGCTCGAATCGAAGGCG

>MC14G3-4

GAGTGCGGCATGTCAAGCCTTTACTACTACTATGTCACAATCAGATATAGCTACAGAGAAAGAATACGCA  
GTAGCTGCAAATGATAAGGAAGCGAAGAAAGGGTGCCTGTTTATGTGATGATGCCGTTGGATAGTGTA  
AGATGGATAATACTATAAATCGGAGGAAGGCGATGAATGCGATTTTGCAGGCG

>MC14G3-5

TCGGGGGCTGGATAAGCTCAGGTGGGTCCAACAACCCAGAAACATGGTTGTAAATAGGCTTATCAACAG  
GTTTACCTTGTTTCAAAGCG

>MC14G3-7

CAACAGTAACACATGGGAATCTTGCTCCG

>MC14G3-12

TGTGAAGCTAAAGAAGAAGCTGGGGAAGGTTGAGGGAAAGATAGAAGCCCTTCTTATAAAGAAGGCTAA  
CCTCTTGCTCTCG

>MC14G3-15

AAAAGGAGGGCGCATCTCACTGATAAGGTCATCGGTCAGTTCGGGCAGGGCAGCTCGGAGTTTGGG  
GACAGTTTCGGGCG

>MC14G3-16

GAGTGCGGCATGTCAAGCCTTTACTACTACTATGTCACAATCAGATATAGCTACAGAGAAAGAATACGCA  
GTAGCTGCAAATGATAAGGAAGCGAAGAAAGGGTGCCTGTTTATGTGATGATGCCGTTGGATAGTGTA  
AGATGGATAATACTATAAATCGGAGGAAGGCGATGAATGCGAGTTTGCAGGCG

>MC14G4-1

GTAGACTGCGTAGTGATCTCGAAGTGGAAATCGGGCATCCTTGTGCACATGGGGAGATTTGAGCACACAGT  
AAATCCTCTTCTTTGTGCGCAATGGTACAGGCG

>MC14G4-2

CCTGGAAAATCCAGATAAAGAAGATTGGTTGGAATATTCTGCTGAACTTTGTGGAGGAACCCACATATCT  
AATACAAGAGAAGCTAAGGGATTGCTCTTTTATCTGAGGAGGGAATTGCCAAAGGAATTTCGAGAGTGA  
CAGCTGTTACATCTGACTGTGCTTTGGAAGCGGTGGAAGTGGCATCTTCCCTCAAGCAGGAAGTGGAA  
TGGC

>MC14G4-3

GGCATGTAATGAACAATCAAGAAGCGGTGGACTGTG

>MC14G4-4

CACTTCTGAGCATTGCTGTTGGGCTACCGAATGTAGGCCCTAACTTTGAGCGGTGGAATGCTGGGATTCTT  
GGTCCTATTTG

>MC14G4-5

GAGGCAAAAAGATTTATTAGGTGATGATTGGGTGCAAAGGCATAGAAGAGTTGTTTCAGCAGCATGCAAAT  
CAATATAAAAAGGATTGCATGGGCTAAGATTCTGCAATCTCTCTCCACACAGGGCTTGACCTCTTCTGGAG  
GAGGCGGAAGTGGAGTTGCTGTTGATGGGGGAAATAGTAGTGGAGTATCAAGAGCG

>MC14G4-6  
CCATCCTCCTCCTCCTCCTCACCACCACGAGAAGAGTATCGGGTACCACCACCACCACCTCCATATCCTC  
CGCCACCACCTTCACGGCGACCTCCACCATAACCACCACCTCCACCACCGTATCCTCTGCTTCCCTCCTCCA  
CCGTAACCTCCACCGCCACCTTCACGTCGACCACCGCCCGCGTATCCTCCGCCACCACCGCTGCGGAATCC  
ACCGCCACCTCCGCGGCTGCGAGATTGAGCCTCG

>MC14G4-9  
GCTGTAGGATTCTCAATTGCCACAATCCTACTGTCTTCATGGGCG

>MC14G4-10R  
CGCCTTCGATTTCGAGCAGCAGCAGCAGCACCAGTTTCGCTGTCCCAGTGGCGACTTACGTCTGTTGGGATGC  
ATCCAGTTTTTCTCAATTTCACTATCCTTCATGTTTACGAGCAGCCTGCCT

>MC14G4-10  
AGGCAGGCTGCTGAACATGAAGGATAGTGAATTTGAAGAAAACTGGATGCATCCCACGACGTAAGTCG  
CCACTGGGACAGCGAAACTGGTGCTGCTGCTGCTGCTCGAATCGAAGGCG

>MC14G4-13  
GAGCGCAATGACAACTTCGCAGTGATGATACTTCTGAAAAGTCAAGAGCCAGATCAATGGAGCGATAT  
GGAAGAGAGCATTGAGTTGAAAGAGTACCTGAGCGGAGGATTGATAGGGGTTTTGATGGCG

>MG5G1-4  
TCTCCATCTCCATTGATGAGCTTCACTAATCGTAGCTTGAACATTGTTGCTAAACTTCACCTTCATCGCT  
TGATATTGC

MG5G1-5  
GATAAGAACGCGGCATCAAATTGAGAAATTTTACAAGCTTAACCATCCGAGGTTTTACTCCAGCAACACA  
AGCACTGACCAGCGACGCCCCCTTC

>MG5G1-7  
GCTAGAAACAGAATCCGATGCCAACATTTTTCTGGAATAAAGGAAGGCTTGATCTCA  
TTCGTTGAACCATCGCCATTTCTTC

MG5\_G1\_8  
CCAGATGCTATGGCCATTTATTGAGTTCACACGACACTTTTTTTGTTCTTCTCTCTCATAGCTGACAGAAA  
GAAAGCACACATATCGTTCATAATAACATAAGAGACGGATGCTCGTT

>MG5G1-10  
TGCCCGAACATCATGACTGCAAATGCCGAGGACATTTGGAATAATGCAGGAATGAAAAACGAAATCCTC  
CAAGCTGCAAACGGTGTGGACCCTGTC

>MG5G1-13  
GGTCCATCCAGAAGGAAAAATATGTAGTTGATGTTGATAAGAGCATTGACATAACAAAACTCACACCTTCC  
ACCAGAGTCGCTCTTCGCAATGACAGTTATGTCCTCCATCTGGATGGACCTTTAAGGAGACTCGACACCCC  
GTATACAGGGGTGTCCGACATAGAAACAATGGAAAATGGGTTTGCGAAGTTCGTGAGCCTAACAAAAAG  
ACTAGAATTTGGCTCGGGACATTTCTACAGCTGAAATGGCTGCACGCGCACATGATGTAGCTGCGATGG  
CACTTCGTGGGAGTCTGGTGCTTGTC

>MG5G1-14  
CAGTAGTCGTGACAGAAACAGGCTGGCCATGGAATGGGGGGCATAATGAGCGCGAGGCCTCAGTGAAAA  
AAACTCAGGCTTACACTAAAAATTTGATCCAAAGGGTTTTGAATAACTCGGGTCCGACAAGTCATCCACC  
GATGCCAATAAACACATACATTTATGAGTTGTTTAAACATTTCCCAGTAGGTTTCGGGTTGAGGATGCTCA  
AGGGGATCTCCATACACTTTGATGTAGATGTGAGCAAAATCCTGGCTCCAACACGCTCGGCAAGTCCTA  
GCATGTTTCAGAGTACCCATCACATTTGTC

>MG5G1-15  
TCCTGAAGAATTGATCCTCATCATTTTTGAAGATCAGCCAATGAAATCTCAAACACTCTGTGC

>MG5G1-16  
CTTTCCTTCTTAGGAACCGAAAAATATAATTACAGAGAAAAGGCACTGCAGGCAATGATATACTCAACT  
TTCCCTTCTTC

>MG5G2-1  
GCCTCCCATTCAGATGACGTAGCTATGGACTGAACCTCCTGAAGAAGAAATCCT  
TTCTGTTC

>MG5G2-2  
TTGGCTGCCAGTGGGTGATTCTTGGGCATTCTGAGAGAAGACACGTTATTGGAGAAAAGGACGAGTTTAT  
AGGGAAAAGGCTGCATATGCTC

>MG5G2-3  
TAGCCACAGGGAAGCAATCCTCTCCTTTTGTTCATGGATCAGGTCATGTTGACCCAAACAAGGCTC

>MG5G2-5  
CAAATGCCATAAAAACACTAAATAGGATTGAAGCAATCCAGAAAATCTGTAGGGACTCTGGAACCTC

>MG5G2-6  
CGTCGAAGGTCAATCTCTTTGGCACACCCCTCAGCATTAGCACCCGAGGCAATAAGGGCAGAAGTAGCGAG  
AGCGAGGCCGGCAAGTTTGGTTGCATCAACACACTTGTAGCTAACTC

>MG5G2-7  
GCTGCTCAGTAGCTTGTTCACAAAGGCAGGTGCCTCTCTGTGAATAGGGAGATAGT  
GATCGGTC

>MG5G2-11  
GAGGCTTCAGAATGGTTCAGACGTTTCGAGGGGTGGCATTGGAGGGTGAAAAGGGTCGTAAGTGTGCGACCTC  
ACGCCGCCTGCTGTGGAGGCCATTGCGGAGAGTTTCGGCGAGTGTTGATAGCAAAGTTGAGAGATGATC  
ATGAGAAGGCTAAAGATGTTACGGTATCCCTAGGACG

>MG5G2-14  
CAGCTGTGGAGAGTTTTTGGACCAATGCAAGAACTGTGAGAAGGAAGCTGTGAATGTT  
TCCCTTGGAAACCTC

>MG5G3-1  
TCATCAAGTAAAGAATCAACCTCAAATCTTTTCTCCAACGAGCAGTATTTCTAATCATAGTGAAAGCATC  
TTTCACTCTATAATCTCTTGCTC

>MG5G3-2  
TGCACCGTTGTAGTCAGAGGATTGAAAATTTTGGCGTACGAACATATTTGAATTATTATGCTTCACCATGG  
TTTTATGATAGTTTGTACAGACGAGAAATGAGTTTGTGCGAGTTCGTTATGTTTTCTTTACCATC

>MG5G3-4  
GAAACGACGACCGAGAGGGATTTGCCAATCTTTGTAGTCCACAACCTGTGTTTCTGATTCTTTGTTTC

>MG5G3-5  
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
ACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTCCGACC  
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG  
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCG  
ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA  
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGG  
CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA  
AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCA  
GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
TGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTT  
AAATTAATAAATGAAGTTTTAGCACGTGTCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTGCCGGCC  
GGGTCGCGCAGGGCGAACTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCCGATCTCGGTTCATGGCCGGCCCGGAGGCGT  
CCCGGAAGTTTCGTGGACACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGTCCGCGCACCCACACAC  
AGGCAAGGGTG

>MG6G1-1  
CCCAAGAAGTCAGTGGAGATGCTCTCGGAGAGGAATTCAAGGGCTAC  
GTC

>MG6G1-2  
TCCTTGCCATTGAAGCAGCCCTAATGTAGTACCAATCAGGGTCATAAGGGGCAAGTTCCTTCAGAACACC  
AGTC

>MG6G1-8  
GTAGACTGCGTAGTGATCTTGCCCGAACATCATGACTGCAAATGCCGAGGACATTTGGAATAATGCAGGA  
ATGAAAAACGAAATCCTCCAAGCTGCAAACGGTGTGGACCCTGTC

>MG6G2-1  
ATGCTATGTTACAAACTCTTATGTGTTTCTTGTGAGTGCTCTCAGATTTTCAGGAGATAAGGGCCCGGAAAA  
GGTTGATACAACCTGAAGCTGTTTCATCTCTTGAGTGAGAAGCAAATTCAGATTGGGCATACATTTGCTGTC

>MG6G2-2  
CAGAAGAGGATTCGTTTGCGGAGATGCTAAAATCGACCCACCAGCAGAACTGATAACTTCGTTGCTCAA  
GTTATCGTTC

>MG6G3-1  
GTAGACTGCGTAGTGATCCAGAAATGACAGTGAGCAAGTTGTTACCGAAGGGGTCGCTAAGATGAGCAG  
ACAAGTTCTCAACTGGGCCTTGGCCTGTCACATAGGCTTGAATGAAGAAGCCCAACATTGAAAACATTGC  
AAGTCTACCATTCTTGATCTCTTTACCTTCAACAAGGCTGCCTTGTCTGGGTTCATTGGCTAGGCCCAATG  
GGTCAAATGGACCTCCTGGGTGAAGTTTGTCTCCAAGTCCAAACCATTGGTGATTCTGAAGTACTCAGC  
ACCACCAAGAAGAACAACCTCAGCAACAACAGCAGCAATAAGGTTGATGGGAATGTTCTTTCCAAAGTA  
GTTCAAGGTGTTCCCATCTAGCAGCAGGGCACCAGTC

>MG6G3-2  
GGCTCCTCACAGAAGTTTGAGTTGAGGCAGCCTCTTGCTCCATGCGTCCTGCAATGTGAGAAAGTGCTGC  
AACAGCTGGACCACTAAGAAGCCGTTGTGCATGTC

>MG6G3-3  
GCTGCTCAGTAGCTTGTTCACAAAGGCAGGTGCCTCTCTGTGAATAGGGAGATAGTGATCGGTC

>MG6G3-5  
CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA

>MG6G3-6  
GCTAGATGTACATATGCCTGTGCTCTTCTGTAGAGCGCTTTGACATTCATACTTTCCAATTCCAATACCTTG  
GTGCAGAGTTTCTCTGCTTCCTTATATTCTTTCAACTTCAGCTTGCAGGCTGCATTATTCAAGTTGCAAGAT  
ACCTTCAAGACCTTGCCTGCTTCTTCTTCTCACTAAACGATGAATCGTACTCAATATATTTGGCAGC  
CTTCTCATATCGCTTTGATGCTCTAACATATTTGCCAGCTTTGAATAATGCATTTCTTCTTCTTCTTCTTG  
CCTGATGCCTCAATTTTCTTCTCAGTATTCATATCCCAAGATTCCTTCTCCTTCTCAAATGAAACCAATTCT  
ATTTGTAACACACTGTAGAGTTGGGAGGAACCACAGCCAAGTCTGCTTAGTTTCCAATGAGCCAAAAG  
CATACTCTGGAGCAATTATCAATGAAGCCACTTCTCCTTTCTTCAATGCAATACGGCTCTATCGAGCCCC  
TGAATAACTTGTTCTTCATCTGTC

>MG6G3-9  
CACCCTGCCTTGCAATAGCAGAATAGGCTTCAGCAAGTAAATTGTCTATCGGTACAAGTTCTTCAGGG  
GCTGGACCAGTCTTCTTCTTCAGCACATCTAATGCTTCGAAAACCTTTCTCATGCGAGTC

>MG6G3-10  
GCTGAAATGACAGTGAGCAAGTTGTTACCGAAGGGGTCGCTAAGATGAGCAGACAAGTTCTCAACTGGG  
CCTTGGCCTGTACATAGGCTTGAATGAAGAAGCCCAACATTGAAAACATTGCAAGTCTACCATTCTTGA  
TCTCTTTACCTTCAACAAGGCTGCCTTGTCTGGGTTCATTGGCTAGGCCCAATGGGTCAAATGGACCTCCT  
GGGTGAAGTTTGTCTCCAAGTCCAAACCATTGGTGATTCTGAAGTACTCAGCACCACCAAGAAGAACA  
CCTCAGCAACAACAGCAGCAATAAGGTTGATGGGAATGTTCTTTCCAAAGTAGTTTCGAGGTGTTCCCATC  
TAGCAGCAGGGCACCAGTC

>MG6G3-11  
AGCTTTGCCTTATTCTTGGGGTTTTGGGAGAATTAGGAGTGGAAGGACGGGCTTGTGTTGTAAGTGGTGG  
ACAAGTAATCACAATACTTGCCTTCTATATCACCATAGGTC

>MG6G3-16

CCATGAAATTACGGCCGTCCGATGATGACGACGACGATGATGATAAAGATGTTGCGTCGGGATGGTACAG  
CTTAGCTAAGCTCCTGTAAGCCGTC

>MG6G3-20

AGAAATGACAGTGAGCAAGTTGTTACCGAAGGGGTCGCTAAGATGAGCAGACAAGTTCTCAACTGGGCC  
TTGGCCTGTCACATAGGCTTGAATGAAGAAGCCCAACATTGAAAACATTGCAAGTCTACCATTCTTGATCT  
CTTTCACCTTCAACAAGGCTGCCTTGTCTGGGTCATTGGCTAGGCCCAATGGGTCAAATGGACCTCCTGGG  
TGAAGTTTGTCTCCAAGTCCAACCATTGGTGATTCTGAAGTACTCAGCACCACCAAGAAGAACAACCT  
CAGCAACAACAGCAGCAATAAGGTTGATGGGAATGTTCTTTCCAAAGTAGTTCAAGGTGTTCCCATCTAG  
CAGCAGGGCACCAGTC

>MG6G3-24

TAGACTGCGTAGTGATCCAGAAATGACAGTGAGCAAGTTGTTACCGAAGGGGTCGCTAAGATGAGCAGA  
CAAGTTCTCAACTGGGCCTTGGCCTGTACATAGGCTTGAATGAAGAAGCCCAACATTGAAAACATTGCA  
AGTCTACCATTCTTGATCTCTTTCACCTTCAACAAGGCTGCCTTGTCTGGGTCATTGGCTAGGCCCAATGG  
GTCAAATGGACCTCCTGGGTGAAGTTTGTCTCCAAGTCCAACCATTGGTGATTCTGAAGTACTCAGCAC  
CACCAAGAAGAACAACCTCAGCAACAACAGCAGCAATAAGGTTGATGGGAATGTTCTTTCCAAAGTAGTT  
CAAGGTGTTCCCATCTAGCAGCAGGGCACCAGTC

>MG6G3-25

CCTCCCAAATTTACCCAGAGAATCCAGCTCTACACAGAAAATTACCAAGTGGTTTGATGGAAGCACTGTA  
ATGGATCAGCATCGCGCATTGTATGGTTTTGATTGTGGACCTTGGCGTC

>MG6G4-1

TCTGGCGTACTGTTAGAGGTATGATTCCTCACAAGACCAAGAGAGGAGCTGCTGCTTTGGCAAGGTTGAA  
GGTGTATGAAGGCGTTCACCTTATGACAAAATCAAGAGGGTGTGTTCCAGATGCTC

>MG6G4-2

TGAGAAAACGACTGAACTTTCAAGACGCGAGAGGGAGGAGTTGGAAAAACAGAGGGCTCATGAAAGGT  
ACATGAAGCTGCAAGAACAAGGGAAAACAGAACAAGCAAAGAAGGATTTGGAGAGGTTGAAACTAATT  
CGTGAACAAAGGGCCGAAGCTGCTAAGAAGAGAGAAGAAGAAAAAGCTGCCAAGGAGCAAAAAGAAATC  
TGAAGCCCGGAAATGACAAACTTGAAGGCAAAGGGAAAATATCGGAACAAATCTTTGGTGTTCGGAAGC  
TATAACTTATGTGTC

>MG6G4-4

AAGTTGTCCATGCTGAAGAAGGAACTCTGTGTTCAATTGTTATGTC

>MG6G4-8

AGTGCATGTGGCAAAACTCAAGGGCCACAAACGAGGAATTTGGTCTGTGGAGTTTTACCTGTTGATAAA  
TGTGTC

>MG6G4-11

TCAAGCTCACGTTTCAAGATAGAAAAATCCGTGATCCTGAAATTTGCTGCAGGTAATCACGAAAATTACTTCT  
AAATGGCACAAGTGTGAAAGGGCCATCTCCTATGGTAGTTGTGGCAACAAATACACCCCAAGGTC

>MG6G4-14

AACAGAGTCAATCACTGCACAGAATATCTACTAGCTTGTCCCTTACATAATTGGAGCACTGAGCACCAA  
ATTGCCCATGCCATCAAACACTCCAAAGAAATGAACATTTGAGTTCCCATGCAATCGTGTGTC

>MG6G4-24

TCCTCCTCACTCATCCCGATGTTTCCAGGACATCGAGAAAGTTTCGTC

>MG6G4-25

TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGT  
GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTC  
GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCT  
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT  
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAAGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG  
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAA  
AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGG  
AAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGG

AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGG  
GCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC  
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA  
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT  
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT  
GGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA

>MT5 FO1-3

GGGTAATAACTTGGGCCCTTTTTCAGCACAAACTCCTTCTTACCTAAACGGTGAATTCCTGGAGATTAT  
GGATGGGACACTGCTGGACTATCTGCTGATCCCGAGGCTTTTGCACGAAACAGGGCCCTTGAGGTCATAC  
ATGGACGTTGGGCTATGCTTGGAGCACTAGGCTGCATAACTCCAGAAGTCCTAGAAAAATGGGTAAAGGT  
TGACTTCAAGGAGCCAGTTTGGTTCAAGGCTGGAGCACAAATTTCTCTGAAGGTGGGCTTGACTATCTG  
GGAACCCGAACCTAGTCCATGCTCAAAGCATTCTAGCTGTGCTTGGGTCCAAGTATTCTAATGGGTCT  
AGTTGAGA

>MT5 FO3-1

CTTACAAAGTTGTCTCACTGAGAAAGGTTCTTACAAATTCTACTGCTCTCCTCATGCTGGTGCTGGTATG  
GTGGGAAAAGTTACAGTTAAACCGATTGATGAAAGCTCTTGCATCACACGATCAGGATTAGCCCCATCCT  
TGTCGATCTTATTA

>MT5 FO3-3

GGAGAAGTTGATGGTCAGGGGAGCTTGCAATCTTGTCTCCTGAAACAGGTCTTTCTATGTAAGTGTTC  
TCCATGGGGTCAACCTGGAATGAATTGCAAAAGGAATATATAGTTCCGCAACCTCATTCTCTCGCATTTC  
CGAACCAAGTTATCCCATGCCATATTGTCTATTACTCAAGAACCATCCA

>MT5 FO4-1

GCTTGATGGACCTGCTTCGAATTTCTGAATGACCTCATAACCAAAGGTGCGGT  
CACGGTGCCTGCTTATTTCAATGATTCTCAAAGAACCCGACAAAAGATGCCGGGCGCATTGCTGGGTTG  
AAATTTCTTCTAATTATAACACAGGAATCATCATCTTGTGCGATCTTATTACTCAGGACTCATCA

>MT5 FO6-1

CGATTTCTGAATGACCAATTAACCTGGCTGTGGTCACGGGGCCTGCTTATTTCAATGATTCTCAAACA  
TCAACTAAGGATGCCGGGCGCATTGCTGGGTTGGAAGTTCTTCGAATTATTACTCAG

>MT5 FO6-3

TGATGCGGTGATTTCTGCACTGATGCTGGACCTGGTGAATTGGGTCCATGGCGTAATTGGAGGATGGTCT  
AATCAACCTTAACTTTGAAGGCCGACCAATCAATGGTTGCGGAAGATTACTCATTATTA

>MT5 FO9-2

AAGAACATATTTGAGTTATTATGCTTCTCCATGGTTTTGTGATATGGTTATTACCACAGACTCACNTCATT  
TATTACTCAGGACTC

>MT5 FO9-3

AATGATTCTGCTCCTCCACTGTATCCTAGATTTCCAATGATATACAAGCCATTA

>MT5 FO11-2

ATTATTACTCAGGACTCACANNTGTGTTGTTTTGGTTTTATTGCTCAGGACTCTTCA

>MT5 FO11-3

TGCTGGCANTCGGCTTCCCCCGCATAGAT

>MT5 RA1-1

CAAGAATGTCAATCTTATAGGCAAGATGGATGTATATGTGGTGGTTCATCTGTCTGATGATCCTAAAAAC  
AAGCAAAAACTCCGGTTCATCAAGATGGTGGGACGAATCCGTCATGGAATTATGTGATGAGGTTACTG  
TCGATGATGCTGTTGCTGCCAAGCCTGGCAAATATGTTGTA

>MT5 RA1-3

GGAACAATTGGATGAAGACAGTGGTTCAGATGATGGAACGCATCACTAAGGAAGAATGGATAGTTACGA  
ATACAACAGTAGCTTCTTCTCAAATATGAGCAAGTGAAGTAAAATATGGCTAGGGCTAAAGCCATGTAC  
ATCAAGACTTCTCAGGCCTGATACAATCAAAGAGATTAGGTTA

>MT5 RA2-1

AAAAGTTGCACCAAGGGCGGCATAGCCACCGTTACCAGTGATTTTCGGCACTAATGCTGGACCTGGTGATT  
GGGTCCATGGTGTAAATTGGAGGAGGGTGCTACATCGAGCTTAGCTTTGATGGCAGACCAATCAATGGTTG  
CGTAGTTA

>MT5 RA2-2

GCCTAGAATAAAAACGATGTCAATTTTTTCATGATTCTGGAACTTCTGCTGTTTCGAGGGAACGGAGGA  
GAAGAATAATGATCAGCTACTTTGAATTTGTTCTATGTTAGTGGTTGTCTAATGGTAGGAGATACCACTAA  
ATTGTTA

>MT5 RA2-3

GATGCCATGAAGATGAATAATAAACCCAAAAGCAATGCTGGCTTCAAATATTTGAGTGATACCATTTAAG  
CAAAACATCCTGCTTAGCCACTGAGATTACTGATTAGCATGTTGCTTATCTTACACTTACGACACGTTTGG  
TAGTTGG

>MT5 RA3-1

GCAGGTAACAAGTTCAGGATGTCACTGGGTCTTCCAGTGGCAGCAACAGTAACTGTGCCGACAACACAG  
GAGCAAAGAATCTTTACATAATTTTCAGTGAAGGGTA

>MT5RA4-1

GTCCGCCTACTCTACTGCATAGATTGGAAGCGCTTCATGATCAATACGCTCATATCAAGATATCGTTGGGC  
GCAATTA

>MT5RA5-1

TTGAGCTAGTGGAGTTGCTGTTTCATTTAGTAGCTGTTAGGCAATTGGAATCAGTTGTTTTGGTTTA

>MT5RA6-1

CCTGTGTGTACCCATCCTTGATTATCAATGGTCGACTTGGTGGCTTGTGATTA

>MT5RA6-2

CGGGTGTGCCAGCTAAGCTGATCTTGGCAACCGAAGCAAACTAGCGCGTGTTA

>MT5RA7-1

CGTGAAATAAAAAGAAGAAAGCAAAGAATGTGAGTGTTA

>MT5RA7-3

CTACCTGTCATAAACTAGTACTTGAAGTATGTGCTGCTA

>MT5RA8-1

CATGCCACATATATTTGCGATCTATTAGAGTTTGTTA

>MT5RA8-2

CAGCAAGAGGGCCAACACATTGAACACCCGCATTA

## **ALLEGATO B**

### **CARATTERISTICHE DELLE SEQUENZE TDFs**

**(TIPO DI MODULAZIONE, n° DI TDF NEL CASO CORRISPONDANO ALLO STESSO TC, ANNOTAZIONE FUNZIONALE, SPECIE DI RIFERIMENTO, %SIMILARITA', ACCESSION NUMBER O NUMERO DI TC E CATEGORIA FUNZIONALE DI APPARTENENZA)**

TDFs	N°	Annotazione funzionale	Specie	Putative-ID	Sim	Categoria funzionale
MC13-RA1-3	3	EF1 $\alpha$	<i>Actinidia deliciosa</i>	TC5035	H	Sintesi proteica
MG6G3/1	2	Chlorophyll a-b binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4294	H	Fotosintesi
MA5FO1/1	2	NADPH:cytochrome P450-reductase	<i>Glycine max</i>	BQ489303	W	Fotosintesi
MC8G3-14	2	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	<i>Spincia oleracea</i>	TC5972	H	Fotosintesi
MC14G1-2	2	Quinone-oxidoreductase	<i>Hellianthus nanus</i>	TC5002	H	Respirazione cellulare
MC14G1-6	2	Stress kinase	<i>Medicago truncatula</i>	TC6824	W	Risposta agli stimoli
MC14G1-9	2	Cyanate hydratase	<i>Oryza sativa</i>	BQ585493	H	Assimilazione dell'azoto
MC14G1-16	2	Phospholipid transporting ATPase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5523	W	Trasportatori
MC14G3-7	2	Circadian clock associated	<i>M. crystallinum</i>	BQ590336	H	Sviluppo
MC7G1-2	3	Aldehyde dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	TC8777	H	Metabolismo energetico
MC7G3-3	3	Ferredoxin NADP reductase	<i>Spincia oleracea</i>	TC5808	H	Fotosintesi
MC13-RA2-4	+	Rybosomal protein	<i>Populus trichocarpa</i>	TC4407	H	Sintesi proteica
MC13-RA2-8	+	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Prunus persica</i>	TC4274	H	Metabolismo amminoacidico
MC13-RA2-10	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC13-RA3A-5	+	S-adenosyl L-methionine synthetase	<i>Beta vulgaris</i>	TC4127/ET	H	Metabolismo amminoacidico
MC13-RA4-1	+	UDP-glucuronic acid 4-epimerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ588454	H	Metabolismo dei carboidrati
MC13-RA5-3	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4510	H	U.F.
MC13-RA5-8	+	UDP-glucuronic acid 4-epimerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ588454	H	Metabolismo dei carboidrati
MC13-RA7-1	+	60S ribosomal protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4347	H	Sintesi proteica
MC13-FO2-1	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8679	H	U.F.
MC13-FO2-2	+	SKP1 component-like	<i>Vitis vinifera</i>	TC4678	H	Sintesi proteica
MC13-FO3-3	+	chloroplast precursor	<i>Spincia oleracea</i>	TC7432	H	Fotosintesi
MC13-FO3-5	+	40S ribosomal protein	<i>Populus trichocarpa</i>	EG552133	W	Sintesi proteica
MC13-FO6-13	+	S-adenosyl L-methionine synthetase	<i>Beta vulgaris</i>	TC4127	H	Metabolismo amminoacidico
MC13-FO8-4	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC13-FO8-5	+	Putative prunasin hydrolase isoform	<i>Oryza sativa</i>	BI096318	W	Metabolismo dei carboidrati
MC13-FO11-2	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC13-FO11-7	+	Ethylene signaling protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	BQ583639	W	Risposta agli stimoli
MC13-FO13-2	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC13-FO13-3	+	Glutaredoxin-C9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7826	H	Risposta agli stimoli
MA6/G1/1	+	Probable monodehydroascorbate reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ588504	H	Risposta agli stimoli
MA6/G1/2	+	Carbonic anhydrase chloroplast precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7432	H	Fotosintesi
MA6/G1/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MA6/G1/5	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7034	H	U.F.
MA6/G1/10	+	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Vitis vinifera</i>	TC7443	H	Metabolismo dei carboidrati
MA6/G1/15	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7034	H	U.F.

TDFs	N°	Annotazione funzionale	Specie	Putative-ID	Sim	Categoria funzionale
MA6/G1/21	+	Ethylene response factor	<i>Vitis vinifera</i>	BQ488415	H	Risposta agli stimoli
MA6/G3/1	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8060	H	U.F.
MA6/G3/2	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ586165	W	U.F.
MA6/G3/3	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ595710	W	U.F.
MA6/G3/4	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC6459	W	U.F.
MA6/G3/5	+	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Suaeda salsa</i>	EG551090	H	Risposta agli stimoli
MA6/G3/6	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5775	H	U.F.
MG6G1/1	+	U.F.	<i>Solanum lycopersicum</i>	TC4445	H	U.F.
MG6G1/2	+	ribosomal 40S protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5541	H	Sintesi proteica
MG6G1/8	+	retrotransposon protein;similar to XP_47330	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP9934707	W	Retrotrasposoni
MG6G3/2	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G3/3	+	ATP synthase subunit beta	<i>Vitis vinifera</i>	EG551062	H	Respirazione cellulare
MG6G3/5	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G3/6	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ489018	H	U.F.
MG6G3/7	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G3/9	+	30S ribosomal protein S20	<i>Vitis vinifera</i>	TC4308	H	Sintesi proteica
MG6G3/11	+	Flavonol glucosyl transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8333	W	Metabolism secondario
MG6G3/16	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ585201	H	U.F.
MG6G3/25	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EG550390	H	U.F.
MT5/RA1/1	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC4974	H	U.F.
MT5/RA1/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA2/1	+	Jasmonate-induced protein homolog	<i>Atriplex canescens</i>	TC4140	H	Risposta agli stimoli
MT5/RA2/2	+	Phosphofruktokinase	<i>Spincia oleracea</i>	TC8109	H	Glicolisi
MT5/RA2/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA3/1	+	Ribosomal Pr 117	<i>Triticum aestivum</i>	TC4642	H	Sintesi proteica
MT5/RA4/1	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA5/1	+	60S ribosomal protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC6944	H	Sintesi proteica
MT5/RA6/1	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA6/2	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA7/1	+	Inositol phosphate kinase	<i>Glycine max</i>	TC6775	W	Trasduzione del segnale
MT5/RA7/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5-FO1-3	+	Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2	<i>Spincia oleracea</i>	TC5041	H	Fotosintesi
MT5-FO3-1	+	Plastocyanin chloroplast precursor	<i>Spincia oleracea</i>	TC5540	H	Fotosintesi
MT5-FO3-3	+	Acid phosphatase precursor	<i>Phaseolus vulgaris</i>	BQ583666	H	Metabolismo dei carboidrati
MT5-FO4-1	+	Cytosolic heat shock 70 protein	<i>Spincia oleracea</i>	TC4609	H	Risposta agli stimoli
MT5-FO6-1	+	Cytosolic heat shock 70 protein	<i>Spincia oleracea</i>	TC4744	H	Risposta agli stimoli

TDFs	N°	Annotazione funzionale	Specie	Putative-ID	Sim	Categoria funzionale
MT5-FO6-3	+	Sec Y-independent transporter protein	<i>Beta vulgaris</i>	TC4144	H	Trasportatori
MT5-FO9-2	+	60S ribosomal protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5492	W	Sintesi proteica
MT5-FO9-3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MG5G1/4	+	Salt-induced protein	<i>Artiplex canescens</i>	TC4553	W	Risposta agli stimoli
MG5G1/5	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ583184	H	U.F.
MG5G1/7	+	Oligomycin sensitivity conferring protein	<i>Silene heuffelii</i>	BQ586848	H	Respirazione cellulare
MG5G1/8	+	Metallothionein	<i>M. crystallinum</i>	TC6668	H	Risposta agli stimoli
MG5 G1/10	+	Ribonuclease P activity	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7913	W	RNA metabolism
MG5G1/13	+	26S proteasome AAA-ATPase subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5235	H	Respirazione cellulare
MG5G1/14	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ593961	W	Risposta agli stimoli*
MG5G1/15	+	40S ribosomal protein S3a-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	TC4186	H	Sintesi proteica
MG5G1/16	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ591390	W	U.F.
MG5G2/1	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC5393	H	Risposta agli stimoli
MG5G2/2	+	Cell division protein ftsZ homolog	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8113	H	Fotosintesi
MG5G2/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MG5G2/5	+	Squalene synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ592342	W	Metabolismo dei lipidi
MG5G2/6	+	Oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>Spincia oleracea</i>	TC5625	H	Fotosintesi
MG5G2/7	+	ATP synthase subunit beta	<i>Nicotiana sylvestris</i>	TC6526	H	Respirazione cellulare
MG5G2/11	+	Phosphoglucosyltransferase precursor	<i>Spincia oleracea</i>	BQ489776	H	Metabolismo dei carboidrati
MG5G2/14	+	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	<i>Spincia oleracea</i>	TC7432	H	Fotosintesi
MA5FO1/2	+	Oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>Spincia oleracea</i>	TC5625	H	Fotosintesi
MA5FO4/1	+	U.F.	<i>Oryza sativa</i>	TC8060	H	U.F.
MA5FO6/1	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ589193	W	U.F.
MA5FO6/3	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC5677	W	U.F.
MA5RA2/1	+	Farnesyl diphosphate synthase	<i>Panax Ginseng</i>	TC6106	H	Metabolismo secondario
MA5RA3/2	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC5734	H	U.F.
MA5RA5/1	+	Ribosomal protein S15	<i>Oryza sativa</i>	TC4630	W	Sintesi proteica
MA5RA5/3	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ594915	H	U.F.
MA5RA6/1	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ593316	W	U.F.
MA5RA6/2	+	Photosystem I reaction center subunit VI	<i>Spincia oleracea</i>	BQ586570	W	Fotosintesi
MA5RA7/1	+	40S ribosomal protein S13	<i>Glycine max</i>	EG550056	H	Sintesi proteica
MA5RA8/1	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MA5RA8/3	+	NADH dehydrogenase subunit F	<i>Beta nana</i>	TC4096	H	Respirazione cellulare
MA5RA9/1	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ585584	H	U.F.
MA5RA10/1	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MA5RA10/3	+	N.H.	-	-	-	N.H.

<b>TDFs</b>	<b>N° Annotazione funzionale</b>	<b>Specie</b>	<b>Putative-ID</b>	<b>Sim</b>	<b>Categoria funzionale</b>
MC14G1-1	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ591680	H	Risposta agli stimoli
MC14G1-3	+ U.F.	<i>Glycine max</i>	TC4392	H	U.F.
MC14G1-7	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC14G1-8	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ586262	H	Risposta agli stimoli
MC14G1-13	+ Germin-like protein	<i>Atriplex canescens</i>	BQ594272	H	Sviluppo
MC14G3-1	+ U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7884	W	U.F.
MC14G3-2	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC7629	W	U.F.
MC14G3-5	+ Phosphoribulokinase, chloroplast precursor	<i>Spincia oleracea</i>	TC4151	H	Fotosintesi
MC14G3-12	+ Nucleic acid binding protein Alfin1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4392	H	Trasduzione del segnale
MC7G1-3	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G3-2	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G3-5	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G3-6	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G3-8	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G3-9	+ Enolase	<i>Vitis vinifera</i>	TC8743	H	Metabolismo energetico
MC7G3-11	+ U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ584265	H	U.F.
MC7G3-15	+ Serine hydroxymethyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4978	H	Metabolismo amminoacidico
MC8G1-1	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC7510	H	U.F.
MC8G1-2	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ589524	H	U.F.
MC8G1-6	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC8G1-7	+ Acquaglyceroporin	<i>Nicotiana tabacum</i>	TC4943	H	Trasportatori
MC8G1-13	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC8G1-14	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BI543235	H	U.F.
MC8G1-16	+ 60S ribosomal protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EG552755	H	Sintesi proteica
MC8G3-1	+ U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7490	H	U.F.
MC8G3-3	+ U.F.	<i>Amaranthus hybridus</i>	BQ587929	H	U.F.
MC8G3-4	+ U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ586998	H	U.F.
MC8G3-6	+ U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC6115	H	U.F.
MC8G3-7	+ Retrotransposabile elemet Tf2	<i>Oryza sativa</i>	CV301870	W	Retrotrasposoni
MC8G3-9	+ Splicing factor SC35	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EG551297	H	Metabolismo dell'RNA
MC8G3-10	+ CP29 polypeptide	<i>Solanum lycopersicum</i>	TC4294	H	Fotosintesi
MC8G3-12	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC8G3-16	+ Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Rhizobium elti</i>	EG549602	H	Respirazione cellulare
MC8G3-18	+ N.H.	-	-	-	N.H.
MC8G3-22	+ U.F.	<i>Oryza sativa</i>	TC5350	H	U.F.
MC8G3-25	+ K11 protein	<i>Beta vulgaris</i>	TC4078	H	Modificazioni post traduzionali

<b>TDFs</b>	<b>N°</b>	<b>Annotazione funzionale</b>	<b>Specie</b>	<b>Putative-ID</b>	<b>Sim</b>	<b>Categoria funzionale</b>
MC8G3-32	+	endo-beta-mannosidase	<i>Beta vulgaris</i>	CF543285	H	Metabolismo dei carboidrati
MC5G1-1	+	Salt tolerance protein 6	<i>Beta vulgaris</i>	TC4796	H	Risposta agli stimoli
MC5G1-5	+	U.F.	-	DV501814	H	U.F.
MC5G1-8	+	Putative ethylene response factor ERF3a	<i>Vitis aestivalis</i>	TC8012	H	Trascrizione
MC5G1-10	+	U.F.	<i>Oryza sativa</i>	BQ592893	H	U.F.
MC5G1-11	+	Casein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ592048	H	modificazioni post-traduzionali
MC5G1-14	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G1-15	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G3-2	+	Glutamyl-tRNA reductase	<i>Vitis vinifera</i>	BQ586417	H	Risposta agli stimoli
MC5G3-3	+	Salt tolerance protein 6	<i>Beta vulgaris</i>	TC4796	H	Risposta agli stimoli
MC5G3-4	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC7683	H	U.F.
MC5G3-5	+	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	<i>Nicotiana tabacum</i>	TC5369	H	Metabolismo proteico
MC5G3-8	+	Putative ethylene response factor ERF3a	<i>Vitis aestivalis</i>	TC8012	H	Trascrizione
MC5G3-13	+	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G3-16	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC6115	H	U.F.
MC6G1-2	+	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	CK136748	H	U.F.
MC6G1-3	+	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EG551352	W	U.F.
MC6G1-4	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BI543348	W	U.F.
MC6G1-6	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ591362	H	U.F.
MC6G1-8	+	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Oryza sativa</i>	TC8061	H	Metabolismo dei carboidrati
MC6G1-11	+	U.F.	<i>Oryza sativa</i>	BQ591058	W	U.F.
MC6G3-1	+	Beta glucosidase precursor	<i>Persicaria tinctoria</i>	BI096318	H	Modificazioni post-traduzionali
MC6G3-2	+	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ594169	H	U.F.
MC6G3-5	+	Splicing coactivator subunit SRm300	<i>Oryza sativa</i>	TC7819	W	Metabolismo dell'RNA
MT5-FO10-2	-	60S ribosomal protein L38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC6944	H	Sintesi proteica
MG5G3/5	-	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	EG549977	W	U.F.
MC14G2-8	-	Alanyl-tRNA synthetase mitochondrial precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7803	H	U.F.
MC14G4-10	-	Quinone-oxidoreductase	<i>Helianthus nanus</i>	TC5002	H	Respirazione cellulare
MC7G4-2	-	PtxA protein precursor	<i>Pisum sativum</i>	TC8390	H	?
MC13-RA6-2	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Oryza sativa</i>	TC4518	H	Metabolismo dei carboidrati
MC13-RA6-4	-	UDP-glucuronate 4-epimerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ588454	H	Metabolismo dei nucleotidi
MC13-RA9-7	-	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ588779	W	U.F.
MC13-FO1-1	-	Allantoate amidohydrolase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	TC6606	H	Metabolismo dei nucleotidi

TDFs	N°	Annotazione funzionale	Specie	Putative-ID	Sim	Categoria funzionale
MC13-FO4-1	-	EF1 $\alpha$	<i>Vitis vinifera</i>	TC6013	H	Sintesi proteica
MC13-FO5-2	-	metallothionein	<i>M. crystallinum</i>	TC7735	W	Risposta agli stimoli
MC13-FO5-8	-	Ubiquitin protein ligase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ58794	H	modificazioni post-traduzionali
MC13-FO5-6	-	HSP 90	<i>Solanum lycopersicum</i>	TC 8256	W	Risposta agli stimoli
MC13-FO7-2	-	Dihydroorotase	<i>Beta vulgaris</i>	TC4109	W	Metabolismo dei nucleotidi
MC13-FO7-5	-	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ586886	H	U.F.
MC13-FO9-6	-	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ594386	W	U.F.
MC13-FO9-8	-	Salt-induced AAA-Type ATPase	<i>Ice plant</i>	TC 5290	H	Risposta agli stimoli
MC13-FO10-1	-	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5328	H	Risposta agli stimoli
MC13-FO10-8	-	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ586255	H	U.F.
MC13-FO10-9	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MC13-FO12-3	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>Medicago truncatula</i>	TC4509	H	Metabolismo dei lipidi
MA6/G2/1	-	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ590376	H	U.F.
MA6/G2/2	-	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ585580	W	U.F.
MA6/G4/1	-	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ590376	H	U.F.
MG6G2/1	-	U.F.	<i>Populus trichocarpa</i>	TC5117	H	U.F.
MG6G2/2	-	Ribosomal Pr 117	<i>Triticum aestivum</i>	TC4642	H	Sintesi proteica
MG6G4/1	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G4/2	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G4/4	-	Protein phosphatase	<i>Nicotiana benthamiana</i>	TC8340	H	modificazioni post-traduzionali
MG6G4/8	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G4/11	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G4/14	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG6G4/24	-	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BQ585991	W	N.H.
MG6G4/25	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA8/1	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5/RA8/2	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5-FO2-1	-	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	CX788990	W	Risposta agli stimoli*
MT5-FO5-1	-	Heat shock 70 protein	<i>Spincia oleracea</i>	TC4744	W	Risposta agli stimoli
MT5-FO7-1	-	U.F.	<i>S. maltophilia</i>	TC7887	W	Traduzione del segnale
MT5-FO7-2	-	aux/IAA protein	<i>Populus tremuloides</i>	TC5759	W	Risposta agli stimoli
MT5-FO8-1	-	aux/IAA protein	<i>Populus tremuloides</i>	TC5760	W	Risposta agli stimoli
MT5-FO11-2	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MT5-FO11-3	-	N.H.	-	-	-	N.H.
MG5G3/1	-	Patellin-1	<i>Curcubita pepo</i>	TC8539	H	Trasportatori
MG5G3/2	-	U.F.	<i>Populus trichocarpa</i>	TC4341	H	Risposta agli stimoli

<b>TDFs</b>	<b>N° Annotazione funzionale</b>	<b>Specie</b>	<b>Putative-ID</b>	<b>Sim</b>	<b>Categoria funzionale</b>
MG5G3/4	Tyrosine decarboxylase 1	<i>Oryza sativa</i>	EG551349	H	metabolismo amminoacidico
MA5FO2/1	Auxin-induced beta-glucosidase	<i>Chenopodium rubrum</i>	TC4241	H	Modificazioni post-traduzionali
MA5FO2/3	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8754	H	U.F.
MA5FO3/1	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ590376	H	U.F.
MA5FO5/1	N.H.	-	-	-	N.H.
MC14G2-1	N.H.	-	-	-	N.H.
MC14G2-2	Alpha-glucan water dikinase1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC8750	W	Metabolismo dell'amido
MC14G2-12	N.H.	-	-	-	N.H.
MC14G4-1	Chloroplast 30S ribosomal protein	<i>Populus trichocarpa</i>	BQ588152	H	Sintesi proteica
MC14G4-3	Protein phosphatase 2C	<i>Solanum lycopersicum</i>	TC4616	H	Modificazioni post-traduzionali
MC14G4-4	Beta-galactosidase	<i>Vitis vinifera</i>	BQ584536	H	Metabolismo dei carboidrati
MC14G4-5	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ591236	H	U.F.
MC14G4-6	Glycine-rich RNA-binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC5177	H	RNA metabolism
MC14G4-9	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	FG344871	H	Risposta agli stimoli
MC14G4-13	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ586681	H	U.F.
MC7G2-1	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ587501	W	U.F.
MC7G2-2	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC6115	H	U.F.
MC7G4-1	26S proteasome	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC6116	H	U.F.
MC7G4-3	T20M3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7088	H	U.F.
MC7G4-5	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ584010	H	U.F.
MC7G4-6	N.H.	-	-	-	N.H.
MC7G4-7	U.F.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC7088	H	U.F.
MC7G4-13	Calcineurin B-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC6451	H	Modificazioni post-traduzionali
MC7G4-20	U.F.	<i>Beta vulgaris</i>	BQ589524	H	U.F.
MC7G4-21	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC6115	H	U.F.
MC8G2-1	U.F.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	EG549584	H	U.F.
MC8G2-2	Ethylene responsive element binding factor 4	<i>Theilungella halophila</i>	TC6470	H	Risposta agli stimoli
MC8G2-3	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ490568	H	U.F.
MC8G2-4	ADP ribosylation factor	<i>Daucus carota</i>	TC4139	H	Metabolismo dei nucleotidi
MC8G2-6	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ593501	H	U.F.
MC8G2-7	Sugar transferase	<i>Bacillus clausii</i>	TC5475	H	Metabolismo dei carboidrati
MC8G4-2	U.F.	-	-	-	U.F.
MC8G4-4	Beta xylosidase	<i>Fragaria x ananassa</i>	BQ589524	H	Metabolismo dei carboidrati
MC8G4-5	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ584229	H	Metabolismo dei carboidrati
MC5G2-1	N.H.	-	-	-	N.H.

<b>TDFs</b>	<b>N° Annotazione funzionale</b>	<b>Specie</b>	<b>Putative-ID</b>	<b>Sim</b>	<b>Categoria funzionale</b>
MC5G2-3	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G4-1	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	TC6115	H	U.F.
MC5G4-2	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G4-3	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Spinacia oleracea</i>	TC4876	H	Metabolismo amminoacidico
MC5G4-5	ADP ribosylation factor	<i>Daucus carota</i>	TC4139	H	Metabolismo dei nucleotidi
MC5G4-6	Voltage-dependent anion channel protein	<i>Spinacia oleracea</i>	TC6149	H	Trasportatori
MC5G4-8	N.H.	-	-	-	N.H.
MC5G4-10	Putative NADH-ubiquinone oxireductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4820	H	Respirazione cellulare
MC6G2-1	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ594169	H	U.F.
MC6G2-2	Chalcone synthase	<i>Dianthus monspessulanus</i>	BQ490532	H	Risposta agli stimoli
MC6G2-3	TIFY 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4681	H	Risposta agli stimoli
MC6G4-1	Beta glucosidase	<i>Trifolium repens</i>	CF543263	W	Modificazioni post-traduzionali
MC6G4-2	TIFY 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TC4681	H	Risposta agli stimoli
MC6G4-3	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ594169	H	U.F.
MC6G4-4	Chalcone synthase	<i>Dianthus monspessulanus</i>	BQ490532	H	Risposta agli stimoli
MC6G4-5	Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2	<i>Spinacia oleracea</i>	TC6974	H	Fotosintesi
MC6G4-12	Integral membrane protein	<i>Beta vulgaris</i>	TC4042	H	Trasportatori
MC6G4-15	U.F.	<i>Vitis vinifera</i>	BQ582592	H	U.F.

## 6. Bibliografia

- Atienza S.G., Faccioli P., Perrotta G., Dalfino G., Zschiesche W., Humbeck K., Stanca A.M., Cattivelli L (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167: 1359–1365
- Bachem C.W.B (2002) cDNA/AFLP. A tool for transcriptome analysis [http://www.plantbreeding.wur.nl/Projects/Markers/aflp\\_cDNA-AFLP.html](http://www.plantbreeding.wur.nl/Projects/Markers/aflp_cDNA-AFLP.html)
- Bachem C.W.B., Omen R.J.F.J. and Visser R. (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol. Biology Rep.* 16: 157-173
- Bahn, S. C., Bae, M. S., Park, Y. B., Oh, S. I., Jeung, J. U., Bae, J. M., Chung, Y. S. and Shin, J. S. (2001) Molecular cloning and characterization of a novel low temperature-induced gene, *bti2*, from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1522: 134-137
- Baud S., Vaultier M. N. and Rochat C. (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 55: 397-409.
- Bellin D., Schulz B., Soerensen T.R., Salamini F. and Schneider K. (2007) Transcript profiles at different growth stages and tap-root zones identify correlated developmental and metabolic pathways of sugar beet. *Journal Exp Botany* 58: 699-715
- Bellin D., Werber M., Theis T., Schulz B., Weisshaar B., Schneider K. (2002) EST sequencing, annotation and macroarray transcriptome analysis identify preferentially root-expressed genes in sugar beet. *Plant Biology* 4: 700–710
- Bennet, M.D., Bhandol, P. and Leitch, I.J. (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals. Botany* 86: 859-90.
- Biancardi E, Casarini B e Ranalli P. (1999) *La barbabietola negli ambienti mediterranei* Ed.Agricole
- Biancardi E., Campbell L. G., Skaracis G. N., De Biaggi M. (2005) *Genetics and Breeding of Sugar Beet*. Enfield, New Hampshire, Science Publishers, Inc. p. 113-114.
- Blum A. and Ebercon A. (1981) Cell membranes stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci* 21: 43-47
- Bosemark N.O., Bormotov V.E. (1971) Chromosome morphology in a homozygous line of sugar beet. *Hereditas* 96: 205-212
- Brandt B. M. (1996) Introduction of Insect Antifreeze Protein Genes into the Model Plant *Arabidopsis thaliana*.

- Brescia M.A., Caputi Jambrenghi A., Di Martino V., Sacco D., Giannico F., Vonghia G., Sacco A. (2002) High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (nmr) studies on meat components: potentialities and prospects. *Ital. J. Anim. Sci.*, 1: 151
- Breyne P., Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vandepoele K., Rombauts S., Vanderhaeghen R., Inze´ D., Zabeau M. (2003) Quantitative cDNA AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Gen Genomics* 269: 173-179
- Burleigh S.H. (2001) Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Science* 160: 899–904
- Butte A.J., Dzau V.J. and Glueck S.B. (2001) Further defining housekeeping, or "maintenance," genes: focus on a compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics*. 7:95-96.
- Calkins, J.B. & Swanson, B. T. (1990). The distinction between living and dead plant tissues – Viability tests in cold hardiness research. *Cryobiology* 27: 194-211
- Childs K.L., Hamilton J.P., Zhu W., Ly E., Cheung F., Wu H, Rabinowicz P.D., Town C.D., Buell C.R., Chan A.P. (2006) The TIGR Plant Transcript Assemblies database. *Nucleic Acids Research*, 35: 846-851
- Coker J.S. and Davis E. (2003) Selection of candidate housekeeping controls in Tomato plant using EST data. *Bio Techniques* 35 (4): 740-748
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W. (2005) Genome-wide identification and testing of superior Reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5–17
- Dohm J.C., Lange C., Wolf M., Schulz B., Weisshaar B., Himmelbauer H. (2008) BeetSeq – A reference genome sequence for sugar beet. 7th Plant Genomics European Meeting, Albena, Bulgaria
- Elliott M.C. and Weston G.D. (1993) Biology and physiology of sugar-beet plant. In Cooke DA, Scott RK, eds *The sugar beet crop: science into practice*. London Chapman and Hall 37-66
- Faccioli P., Ciceri G. P., Provero P., Stanca A. M., Morcia C. and Terzi V. (2007) A combined strategy “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. *Plant Mol Biol* 63: 679-688
- Fieuw S and Willenbrink J. (1990) Sugar transport and sugar-metabolizing enzymes in sugar storage roots (*Beta vulgaris* ssp. *altissima*). *Journal of Plant Physiology* 137 216–223.
- Fieuw S., Willenbrink J. (1989) Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in sugar beet plants (*Beta vulgaris* L. ssp *altissima*). *Journal of Plant Physiology* 131: 153–162

- Foolad M.R. & Lin G.Y. (2001) Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato: germplasm evaluation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 679-683.
- Fowler S and Thomashow M. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-90.
- Frese L., Desprez B., Ziegler D. (1999) Potential of genetic resources and breeding strategies for base-broadening in beta. Cap.17. Broadening the genetic base of crop production . Ed. CABI
- Glare E. M., Divijack M., Bailey M. J., Walters E. (2002) Beta-actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57: 756-770.
- Goidin D., Mamessier A., Staquet MJ, Schmitt D., Berthier Vernes O. (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over gliceraldehyde 3-p dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mTNA levels in invasive and not invasive human melanoma cell subpopulation. *Annal Biochem* 295: 17-21
- Gonzalez M.C., Echevarria C., Vidal J., Cejudo F.J. (2002) Isolation and characterisation of a wheat phosphoenolpyruvatecarboxylase gene. Modelling of the encoded protein. *Plant Science* 162: 233–238
- Gu, R., Fonseca, S., Puskás, L., Hackler Jr., L., Zvara, A., Dudits, D. and Pals, M. S. (2004) Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiol.* 24: 265-276
- Guy C.L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 187–223.
- Haagenson D.M., Klotz K L., Mc Grath J.M. (2006) Sugar beet sucrose synthase genes differ in organ-specific and developmental expression. *J. Plant Physiol.* 163: 102-106
- Herwig R., Schulz B., Weisshaar B., Hennig S., Steinfath M., Drungowski M., Stahl D., Wruck W., Menze A., O'Brien J., Lehrach H., Radelof U. (2002) Construction of a ‘unigene’ cDNA clone set by oligonucleotide fingerprinting allows access to 25 000 potential sugar beet genes. *The Plant Journal* 32: 845–857
- Hesse H., Sonnewald U., Willmitzer L. (1995) Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris L.*) *Mol Gen Genet* 247: 515-520
- Hesse H., Willmitzer L. (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris L.*). *Plant Molecular Biology* 30: 863–872
- Hoagland D.R. and Arnon D.I. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. Circular 347. The College of Agriculture, University of California, Berkeley

- Kaplan F., Kopka J, Haskell D. W, Zhao W., Schiller K. C., Gatzke N., Sung D. Y., and Guy C. L. (2004) Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* 136: 4159 – 4168
- Karetsou K., Koutita O. and Skaracis G. (2005) Development of a quantitative analysis protocol of heat shock protein 70 in heat stressed sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Plant Mol. Biol. Reporter* 23: 195a-195j.
- Kloos D. U., Ottmanns H., Dock C., Stahl D., Hehl R. (2002) Isolation and molecular analysis of taproot expressed genes from sugar beet. *Journal of Exp. Botany* 53: 1533-1534
- Klotz K.L., and Haagensohn D.M. (2007) Wounding, anoxia and cold induce sugar beet sucrose synthase transcriptional changes that are unrelated to protein expression and activity. *J. Plant Physiol* 165: 423-434
- Klotz K.L., Haagensohn D.M., Mcgrath J.M. (2005) Sucrose synthase gene expression is tissue-specific, developmentally regulated and influenced by abiotic stresses. *Journal of Sugar Beet Research* 42: 62-63
- Komatsu A., Moriguchi T., Koyama K., Omura M., Akihama T. (2002) Cell and molecular biology, Biochemistry and Molecular physiology. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles in phylogenetic relationships. *J Exp. Botany* 53:61-71
- Lee B.H., Henderson D. A. and Jian-Kang Zhu J. K. (2005) The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *The Plant Cell* Vol. 17: 3155–3175
- Lee B.H., Kapoor A., Zhu J., Zhu J.K. (2006) STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1736–1749
- Lee Y., Tsai G., Sunkara S., Karamycheva S., Pertea G., Sultana R., Antonescu V., Chan A., Cheung F., Quackenbush J. (2005) The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* 33: D71-D74
- Lehmann J., Atzorn R., Brückner C., Reinbothe S., Leopold J., Wasternack C., Parthier B. (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197:156–162.
- Li Z. Y. and Chen S. Y. (2000) Isolation and characterization of a salt- and drought- inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 156: 386-393

- Lin W. H., Ye R., Ma H., Xu Z. H., Xue, H. W. (2004) DNChip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Res.* 14: 34-45
- Liu W. and Saint D. A. (2002) A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics *Analytical Biochemistry* 302, 52–59
- Liu Y., Schiff M., Serino G., Deng X. W., Dinesh Kumar S.P. (2002) Role of SCF-ubiquitin ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant cell* 14:1483-1496
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402-408
- Lockey C., Otto E. and Long Z. (1998) Real time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques* 24: 744-746.
- Mandolino G. e Biancardi E. (1999) “La barbabietola negli ambienti mediterranei”. *Sistematica e botanica.*; B. Casarini, E. Biancardi e P. Ranalli (editori) Edagricole, Cap 2: pp. 39-56
- Mastrangelo AM, Baldi P, Mare C, Terzi VV, Galiba G, Cattivelli L, Di Fonzo N (2000) The cold-dependent accumulation of COR TMC-AP3 in cereals with contrasting frost tolerance is regulated by different mRNA expression and protein turnover. *Plant Sci* 156:47–54
- Mastrangelo A.M., Belloni S., Barilli S., Ruperti B., Di Fonzo N., Stanca A.M., Cattivelli L. (2005) Low temperature promotes intron retention in two *e-cor* genes of durum wheat. *Planta* 221: 705–715
- Medina J, Bagues M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J (1999) The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol* 119:463–470
- Moffatt B., Ewart V. and Eastman A. Cold comfort: plant antifreeze proteins *Physiologia Plantarum* 126: 5–16. 2006
- Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Botany* 56: 2907-2914
- Nielsen T.H., Rung J.H., Villadsen D. (2004) Fructose-2, 6- biphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science* 9: 556-563
- Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Molecular Biology* 302: 205-217

- Nunes M. E. S. and Smith G. R. (2003) Characterization of Rose Clover Germplasm for Flowering Traits. *Crop Science* 43:1523-1527
- Oppenheimer D.G., Haas N., Silflow C.D. and Snustad D.P. (1988) The beta-tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*: preferential accumulation of the beta 1 transcript in roots. *Gene* 63: 87-102.
- Ortiz C. and Cardemil L. (2001) Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *Journal of Experimental Botany* 52: 1711-19
- Paulinova O.A., Nalekontsev E.N., Prasolova M.F., Turkina M.V. (2002) Sucrose Phosphate Synthase, Sucrose Synthase and Invertases in Sugar beet leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 1: 68-73
- Pearce Roger S. (2001) Plant Freezing and Damage. *Annals of Botany* 87: 417-424
- Peirson S N, Butler J N. and Foster G.R. (2003) Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data Analysis *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 14 e73
- Pestsova E., Meinhard J., Menze A., Fischer U., Windhovel A., Westhoff P. (2008) Transcript profiles uncover temporal and stress-induced changes of metabolic pathways in germinating sugar beets seeds. *BMC Plant Biology* 8:122-142
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research* 29: 2002-2007
- Posmyk MM, Corbineau F, Vinel D, Bailly Ch., Come D (2001) Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. *Physiol Plant* 111:473–482
- Pursiheimo S., Mulo P., Rintamaki E., Aro E.M. (2001) Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and lhcb mRNA accumulation in winter rye. *Plant J.* 26: 317–327
- Quackenbus J. (2002) Microarray data normalisation and transformation. *Nat Gen* 32: 496-501
- Quackenbush J, Cho J., Lee D., Liang F., Holt I., Karamycheva S., Parvizi B., Pertea G., Sultana R., White J. (2001) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Research* 29: 159-164
- Radonic A., Thulke S., Nackay I. M., Landt O., Siegert W. and Nitsche A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 856-862
- Rizza F., Crosatti C., Stanca A.M., Cattivelli L. (1994) Studies for assessing the influence of hardening on cold tolerance of barley genotypes. *Euphytica* 75:131–138

- Russell B.L., Rathinasabapathi B., Hanson A.D. (1998) Osmotic Stress Induces Expression of Choline Monooxygenase in Sugar Beet and Amaranth. *Plant Physiol* 116: 859–865
- Sambrook J. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory Manual*
- Samuelian S., Kleine M., Ruyter-Spira C.P., Klein-Lankhorst R.M. and Jung C. (2004) Cloning and functional analyses of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection. *Plant Mol. Biol.* 53: 147-156
- Seki M, Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M, Oono Y., Kamiya A., Nakajima M, Enju A., Sakurai T., Satou M., Akyama K., Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P., Kaway J., Hayashizaky Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using full-length cDNA microarray. *Plant J* 31:279-292
- Schneider K. (2002) EST sequencing, annotation and macroarray transcriptome analysis identify preferentially root-expressed genes in sugar beet. *Plant Biology* 4, 700–710.
- Schneider K., Borchardt D. C., Schafer-Prel R., Nagl N., Glass C., Jeppson A., Gebhardt C., Salamini F. (1999) PCR based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol Gen Genet* 262: 515-524
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:217-23.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410-417
- Shintu L., Caldarelli S. J. (2005) High resolution MAS NMR and chemometrics: Characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Agric. Food Chem.* 53: 4026-4031
- Shintu L., Caldarelli S. J. (2006) Toward the determination of the geographical origin of Emmentaler cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation. *Agric. Food Chem.* 54: 4148-4154
- Sidersky D. (1931) *Le betterave a sucre, recueil de notes pratiques a l'usage des agricultures.* Paris Les presses universitaire de France
- Sirover M.A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-184
- Stepinski D. (2002) Ribonuclease activity in roots of soybean seedlings subjected to chilling stress and recovery. *Acta Physiologie Plantarum* 24: 297-301

- Stone J.M., Palta J.P., Bamberg J.B., Weiss L.S. and Harbage J.F. (1993) Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum* species: evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *PNAS* 90: 7869-7873
- Strand A., Hurry V., Gustafsson P., Gardestrom P. (1997) Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *Plant J.* 12: 605-614
- Sukumaran N.P. and Weiser C.J. (1972) Freezing Injury in Potato Leaves. *Plant Physiology* 50: 564-567
- Sun M., Li L., Xie H., Ma R., He Y. (2007) Differentially Expressed Genes under Cold Acclimation in *Physcomitrella patens*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40: 986-1001
- Sung Dong Y., Guy Charles L. (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant physiology* 132: 979-987
- Taiz L., Zeiger E. (1996) *Fisiologia vegetale*, Piccin Editore
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A. and Heinen E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295.
- Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 571-599
- Van de Dijk S.J., Maris J.A. (1985) Differences between tomato genotypes in net photosynthesis and dark respiration under low light intensities and low night temperatures. *Euphytica* 34: 709-716
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 1-11
- vegetative growth in tomato: germplasm evaluation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 679-683.
- Venturi G. (1989) *Barbabetola da zucchero*. In Baldoni R., Giardini L., *Coltivazioni Erbacee*, Patron, Bologna: 439-548
- Vernieri P., Lenzi A., Figaro M., Tognoni F., Pardossi A. (2001) How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *Journal of Experimental Botany* 52: 2199-2206

- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. and Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9; 5: 244-252
- Warren G, McKown R, Marin AL, Teutonico R. (1996) Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* Aug;111(4):1011-9.
- Weber WE, Borchardt DC, Koch G (1999) Combined linkage maps and QTLs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) from different populations. *Plant Breeding* 118:193-204
- Weber WE, Borchardt DC, Koch G (2000) Marker analysis for quantitative traits in sugar beet. *Plant Breed* 119:97–10
- Whetten R., Sun Y.H., Zhang Y., Sederoff R. (2001) Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol Biol* 47: 275-291
- Whitlow T., Bassuk N. L., Ranney T. G., Reichert D. L. (1992) An improved method for using Electrolyte Leakage to assess membrane competence in Plant tissue. *Plant Physiology* 98: 198-205
- Willenbrink J., Doll S., Getz H.P., Meyer S. (1984) Zuckeraufnahme in isolierten Vakuolen und Protoplasten aus dem Speichergewebe von Beta-Rueben. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 97: 27–39
- Williams J P, Khan M U, Mitchell K, Johnson G. (1988) The Effect of Temperature on the Level and Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Diacylglycerols of *Brassica napus* Leaves. *Plant Physiol.*; 87(4):904–910.
- Wong M. L. and Medrano J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39: 1-11
- Wood R.R. (1952) Selection for cold tolerance and low temperature germination in sugar beets. *Proc. of the Seventh Meeting of the Am. Soc. of Sugar Beet Technol.*: 407-410
- Yu Jun, Songnian Hu, Jun Wang, Gane Ka-Shu Wong, Songgang Li, Bin Liu, Yajun Deng, Li Dai, Yan Zhou, Xiuqing Zhang, Mengliang Cao, Jing Liu, Jiandong Sun, Jiabin Tang, Yanjiong Chen, Xiaobing Huang, Wei Lin, Chen Ye, Wei Tong, Lijuan Cong, Jianing Geng, Yujun Han, Lin Li, Wei Li, Guangqiang Hu, Xiangang Huang, Wenjie Li, Jian Li, Zhanwei Liu, Long Li, Jianping Liu, Qiyu Qi, Jinsong Liu, Li Li, Tao Li, Xuegang Wang, Hong Lu, Tingting Wu, Miao Zhu, Peixiang Ni, Hua Han, Wei Dong, Xiaoyu Ren, Xiaoli Feng, Peng Cui, Xianran Li, Hao Wang, Xin Xu, Wenxue Zhai, Zhao Xu, Jinsong Zhang, Sijie He, Jianguo Zhang, Jichen Xu, Kunlin Zhang, Xianwu Zheng, Jianhai Dong, Wanyong Zeng, Lin Tao, Jia Ye, Jun Tan, Xide Ren, Xuwei Chen, Jun He, Daofeng Liu, Wei Tian, Chaoguang Tian, Hongai Xia, Qiyu Bao, Gang Li, Hui Gao, Ting Cao, Juan Wang, Wenming Zhao, Ping

Li, Wei Chen, Xudong Wang, Yong Zhang, Jianfei Hu, Jing Wang, Song Liu, Jian Yang, Guangyu Zhang, Yuqing Xiong, Zhijie Li, Long Mao, Chengshu Zhou, Zhen Zhu, Runsheng Chen, Bailin Hao, Weimou Zheng, Shouyi Chen, Wei Guo, Guojie Li, Siqu Liu, Ming Tao, Jian Wang, Lihuang Zhu, Longping Yuan, Huanming Yang (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica* ). *Science* 296: 79-92

Yuan J. S., Reed A., Chen F. and Stewart Jr C. N. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85