

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Agroambientali**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/B1 – AGRONOMIA E SISTEMI CULTURALI
ERBACEI ED ORTOFLORICOLI

Settore Scientifico disciplinare: AGR/02 – AGRONOMIA E COLTIVAZIONI ERBACEE

**ISOLAMENTO, VARIABILITA' ED ESPRESSIONE DEL
GENE *P1MT* IN GIRASOLE**

Presentata da: SILVIA SCACCHI

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Giovanni Dinelli

Dr. Enrico Noli

Esame finale anno 2012

INDICE

1.	INTRODUZIONE	1
1.1	Il girasole	2
1.1.1	Tassonomia, origine e importanza	2
1.1.2	Morfologia e biologia	3
1.1.3	Esigenze ambientali	4
1.1.4	Tipi ed utilizzazione	5
1.1.5	Obiettivi del miglioramento genetico	6
1.2	La qualità fisiologica del seme	8
1.2.1	Il vigore del seme	8
1.2.2	Perdita del vigore: deterioramento	9
1.2.3	Deterioramento durante la conservazione	12
1.2.4	Processi di deterioramento	13
1.2.5	Trattamenti invigoranti: "osmopriming"	16
1.2.6	Meccanismi di tolleranza al deterioramento: sistemi antiossidanti e di riparazione	18
1.3	L-isoaspartil o-metiltransferasi (PIMT)	27
1.3.1	Meccanismo di riparazione proteica	27
1.3.2	Implicazioni nel vigore del seme	33
1.4	Studi genetici sul vigore e sulla risposta al <i>priming</i>	35
2.	SCOPO DEL LAVORO	41
3.	MATERIALI E METODI	43
3.1	Materiale vegetale e produzione del seme	44

3.2	Isolamento del gene <i>PIMT</i> in <i>Helianthus annuus</i>	46
3.2.1	Isolamento della sequenza genomica parziale	46
3.2.2	Completamento della sequenza genomica mediante <i>PCR-walking</i>	48
3.2.3	Isolamento della sequenza codificante parziale	50
3.3	Caratterizzazione del gene <i>PIMT</i> nelle 16 linee	51
3.3.1	Sequenziamento	51
3.3.2	Analisi bioinformatica	52
3.4	Sviluppo di un saggio per l'espressione del gene <i>PIMT</i>	53
3.4.1	Estrazione dell'RNA totale	53
3.4.2	Trattamento con DNAsi e sintesi del primo filamento di cDNA	54
3.4.3	Sviluppo di un saggio <i>real time</i>	55
3.4.4	Progettazione degli oligonucleotidi	56
3.4.5	Amplificazione <i>real-time</i>	58
3.4.6	Validazione dei geni di riferimento candidati	59
3.5	Preparazione del seme per i test fisiologici e di espressione genica	60
3.5.1	Trattamento di <i>aging</i>	60
3.5.2	Trattamento di <i>osmopriming</i>	61
3.5.3	Determinazione della germinabilità	61
3.5.4	Determinazione dell'espressione di <i>PIMT</i>	62
3.5.5	Analisi statistica	63
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	65
4.1	Isolamento del gene <i>PIMT</i> in <i>Helianthus annuus</i>	66

4.1.1	Isolamento della sequenza nucleotidica	66
4.1.2	Caratterizzazione della sequenza aminoacidica	69
4.2	Analisi della variabilità di sequenza	70
4.2.1	Amplificazione e sequenziamento	70
4.2.2	Variabilità genetica della sequenza nucleotidica	71
4.2.3	Variabilità genetica della sequenza aminoacidica	75
4.3	Saggi <i>real time</i> per lo studio di espressione di <i>PIMT</i>	78
4.4	Effetto di <i>aging</i> e <i>priming</i> sulla qualità fisiologica e sull'espressione di <i>PIMT</i> nel seme	80
4.4.1	Test fisiologici	80
4.4.2	Analisi dell'espressione del gene <i>PIMT</i>	86
5.	CONCLUSIONI	95
6.	BIBLIOGRAFIA	99
	TABELLE	137
	FIGURE	151

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo lavoro vorrei esprimere un sincero ringraziamento a tutti coloro che hanno reso possibile questa ricerca.

Il mio relatore innanzitutto Dr. Enrico Noli, per il supporto e il coinvolgimento durante lo svolgimento dell'intero percorso di Dottorato. Le mie colleghe Elena Battistini, per il sostegno durante le attività di laboratorio e di messa a punto dell'esperimento, e Maria Teriaca per il supporto nelle questioni analitiche.

Alle mie colleghe e al Dr. Noli va un ringraziamento speciale non solo per aver reso possibile questa ricerca, ma anche per aver collaborato instancabilmente al raggiungimento degli obiettivi ed essere stati una presenza e un riferimento costante durante questi anni al LaRAS.

Un sentito ringraziamento va anche ai miei colleghi del settore analitico del LaRAS: Giovanni Urso, Emma Beltrami, Eugenio Grassi e Laura Roncarati per la loro collaborazione e supporto nello svolgimento dei test fisiologici sul seme.

Al Prof. Sergio Conti un sentito ringraziamento per il sostegno nelle elaborazioni statistiche.

Infine vorrei ringraziare per la preziosa collaborazione ad alcuni aspetti di questo lavoro Andrea Ricci e Sara Castelletti.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL GIRASOLE

1.1.1 TASSONOMIA, ORIGINE E IMPORTANZA

Secondo una recente classificazione (Jan e Seiler, 2007) il genere *Helianthus*, appartenente alla famiglia delle Asteraceae, comprende 14 specie annuali e 37 specie perenni tra cui include diploidi, tetraploidi ed esaploidi (numero cromosomico di base = 17).

Il girasole coltivato (*Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*), specie diploide e annuale, occasionalmente può incrociarsi con altre specie annuali; mentre più frequentemente si verificano ibridazioni interspecifiche con le specie selvatiche (*H. annuus* ssp. *annuus* e ssp. *lenticularis*) o con *H. petiolaris*. Nonostante numerosi rinvenimenti archeologici testimoniano la presenza nel Messico pre-Colombiano di razze locali di *Helianthus annuus* (Lentz et al., 2008), è sempre più accreditata l'ipotesi che i progenitori del girasole si siano originati, in un singolo evento, nel centro di domesticazione identificato nell'Est del Nord America (ENA) (Harter et al., 2004; Blackman et al., 2011). Studi su marcatori del DNA nucleare e cloroplastico, insieme alla descrizione di aplotipi relativi a geni noti per essere stati coinvolti per "selective sweep" nella domesticazione, sono in accordo nel ritenere che le attuali razze locali messicane sarebbero discendenti dallo stesso pool genetico di quelle americane e che comunque non avrebbero contribuito alle cultivar moderne (Harter et al., 2004; Wills e Burke, 2006; Blackman et al., 2011). La Russia è il maggiore centro di diversità per il girasole coltivato: centri secondari di diversificazione includono l'Europa, l'Argentina, il Nord America, il Nord Africa, la Cina e l'Australia (Vear e Miller, 1993).

Le cultivar moderne derivano da parentali selvatici che più di 5000 anni fa si diffusero dal centro di origine, attraverso la maggior parte del Nord America. Questa coltura, utilizzata già dai Nativi Americani come risorsa alimentare, nel XVI secolo è stata importata nel Vecchio Mondo dagli esploratori spagnoli come curiosità botanica, ed apprezzata inizialmente come pianta ornamentale. La possibilità di usare *Helianthus annuus* come pianta oleifera si è concretizzata nel XVIII secolo in Russia dove ha iniziato ad essere coltivata intensivamente per fini alimentari, e da cui si è diffusa in Europa e nel resto del mondo (Van der Vossen et al., 2007). Le varietà moderne di girasole coltivate in Nord e Sud America (principalmente in USA e Argentina) sono state sviluppate da germoplasma reintrodotta alla fine del 1800 dall'Europa dell'Est (Heiser, 1978; Putt, 1997).

Nel 2009, la produzione mondiale di seme di girasole è stata di 32 milioni di tonnellate, ottenute approssimativamente da 23.8 milioni di ha. La federazione Russa e l'Ucraina sono i maggiori produttori (20% ciascuno della produzione mondiale), seguiti da Argentina (8%), Francia e Cina (ciascuno al 5%).

1.1.2 MORFOLOGIA E BIOLOGIA

La maggior parte delle varietà coltivate di girasole presenta uno stelo robusto non ramificato, foglie larghe, radice fittonante e una singola grande infiorescenza (capolino). Le specie selvatiche sono invece caratterizzate da steli sottili, ramificazione spinta, foglie di dimensioni ridotte, calatidi numerose e piccole (Heiser, 1954).

Il capolino del girasole, infiorescenza caratteristica della famiglia, è costituita da circa 700-1000 fiori fertili ermafroditi disposti in archi concentrici a formare il disco fiorale. All'esterno di esso si trovano i così detti "fiori del raggio" sterili, con petali allungati uniti ai bordi, con funzione vessillare. La lunghezza del ciclo vitale varia dai 75 ai 180 giorni in relazione alle condizioni ambientali e al genotipo.

Il girasole è una specie allogama, con un complesso sistema di autoincompatibilità sporofitica, presente in modo particolare nelle forme selvatiche, ed impollinazione entomofila, condotta da api e bombi; l'allogamia è inoltre favorita dalla proterandria (Snow et al., 1998). Il disco fiorale dà origine a frutti (acheni) dotati un grande embrione sostanzialmente privo di endosperma. Il girasole è pronto per la raccolta quando il dorso della calatide assume una colorazione giallo-marrone e il contenuto idrico del seme raggiunge il 10-12%.

1.1.3 ESIGENZE AMBIENTALI

La coltivazione del girasole si estende dalla fascia medio temperata, fino alle zone subtropicali con clima caldo-secco. Per iniziare il processo germinativo il seme necessita una temperatura di almeno 4 - 6°C; il *range* ottimale di crescita si situa tra i 23 - 27°C, con un minimo 6°C e un massimo di 40°C. La coltura si adatta inoltre a vari tipi di suolo, da quelli sabbiosi a quelli argillosi, purché siano profondi, drenanti e non acidi (pH 5.7 - 8.1), e può tollerare brevi periodi di siccità, essendo in grado di estrarre l'acqua dal suolo in modo più efficiente di altre colture (Hattendorf et al., 1988).

1.1.4 TIPI ED UTILIZZAZIONE

Sulla base dell'utilizzazione le varietà coltivate possono essere divise nei tre gruppi seguenti.

I. I tipi da olio, che rappresentano l'85-90% sul totale della produzione e il 10% della produzione mondiale di olio edibile (FAO, 2009), sono caratterizzati da acheni di piccole dimensioni e scuri ed elevato contenuto in olio (>50%). Questo è di eccellente qualità per l'elevata percentuale di acidi grassi insaturi, la quasi totale assenza di sostanze tossiche, e buone caratteristiche organolettiche. Le varietà tradizionali hanno un contenuto in acido linoleico compreso tra il 45 e il 75%, mentre tra le più moderne, le medio- alto-oleico hanno contenuti in acido oleico variabili rispettivamente tra il 55-75% e tra il 85-90%. L'opportunità di sviluppare varietà con una diversa composizione in acidi grassi, ha permesso uno specifico uso dei tipi di olio. L'acido linoleico è salutare, indicato per produrre margarina o per condire, mentre l'acido oleico è più termostabile e resistente all'ossidazione e perciò indicato per la frittura e la conservazione a lungo termine (Fuller et al., 1967; Van der Vossen et al., 2007; Vollmann e Rajcan, 2010).

II. I tipi non da olio sono caratterizzati da acheni più grandi, spesso neri striati di bianco, a basso contenuto in olio (25-30%). Sono usati per il consumo diretto, come snack o prodotti da forno e come mangime per uccelli (Lofgren, 1997).

III. I tipi ornamentali, usati nei giardini o come fiori recisi, presentano una grande varietà di morfologia florale e di colori (Fick, 1976).

1.1.5 OBIETTIVI DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

L'identificazione dei fattori genetici che controllano caratteristiche agronomiche economicamente importanti, può rappresentare un notevole contributo al miglioramento genetico del girasole. Le caratteristiche di maggiore interesse nei programmi di *breeding* in questa coltura riguardano la resa, il contenuto in olio e la qualità dei semi e la resistenza alle patologie.

Come in altre colture, la resa è un carattere complesso influenzato da fattori genetici ed ambientali. Dal punto di vista genetico è il risultato dell'espressione di vari caratteri quantitativi, caratterizzati da bassa ereditabilità (Fick, 1978; Fick e Miller, 1997). Come criteri di selezione per l'aumento della resa vengono comunemente usati il diametro della calatide, il peso dei mille semi e il numero di semi per calatide (Ahmad et al., 1991).

Il contenuto in olio negli acheni è un carattere determinato da fattori genetici e ambientali, con ereditabilità relativamente elevata (Mokrani et al., 2002). Nelle varietà coltivate l'olio, generalmente, contiene acidi grassi insaturi in proporzione elevata (circa il 90%): il 20% di acido oleico (C18:1) e il 70% di linoleico (C18:2). Il rimanente 10% corrisponde ad acidi grassi saturi, principalmente palmitico e stearico (Garcés et al., 1989). Anche la composizione in olio è fortemente influenzata dall'ambiente, primo fra tutti la disponibilità idrica: la frazione di acidi grassi insaturi cresce in genere all'aumentare della disponibilità d'acqua e con la precocità di semina (Flagella et al., 2002; Anastasi et al., 2010).

Un ulteriore importante obiettivo del miglioramento genetico è la resistenza alle avversità biotiche, in particolare la ruggine (*Puccinia helianthi*) e la

peronospora (*Plasmopara halstedii*); per entrambe le malattie sono stati sviluppati ibridi commerciali resistenti a diverse razze.

Le prime fasi del miglioramento genetico del girasole si sono svolte tra gli anni '20 e '50, ma un decisivo impulso allo sviluppo varietale è stato dato con lo sfruttamento commerciale dell'eterosi, reso possibile dalla scoperta di un sistema di maschiosterilità basato sull'interazione tra fattori citoplasmatici di sterilità (PET1-CMS; Leclercq, 1969) e ristoratori nucleari della fertilità, entrambi provenienti da *H. petiolaris* (Kinman, 1970). Nella produzione dell'ibrido commerciale l'impollinante (C) porta in omozigosi il gene dominante ristoratore della fertilità (Rf) mentre il portaseme (A) è incapace di produrre polline funzionale per la presenza nel genoma mitocondriale del relativo determinate; l' F1 risultante è fertile in virtù della dominanza dell'allele ristoratore del parentale maschile. La moltiplicazione del parentale femminile è assicurata dall'impollinazione con una linea mantenitrice (B) a livello nucleare isogenica ad A, ma con normale citoplasma maschio-fertile.

Gli strumenti di analisi molecolare rappresentano un'applicazione recente al miglioramento genetico del girasole. Attraverso l'identificazione e la mappatura di singoli geni o di regioni cromosomiche che controllano il carattere di interesse (*quantitative trait loci*, QTLs) è oggi possibile utilizzare marcatori molecolari associati a questi loci in programmi di selezione assistita (*marker-assisted selection*, MAS). Molti studi sono stati condotti in questa specie per l'identificazione di QTLs implicati nel controllo di importanti caratteristiche agronomiche, quali il peso dei mille semi, il numero di semi per pianta e la precocità (Mestries et al., 1998; Mokrani et al., 2002; Al-

Chaarani et al., 2004; Haddadi et al., 2011). Anche il contenuto e la qualità in olio dei semi di girasole si è visto essere controllato da una serie di QTLs (Leon et al., 2003; Perez-Vich et al., 2004). I marcatori molecolari hanno dato un notevole contributo anche riguardo al miglioramento per la resistenza alle malattie. Nel caso della resistenza alla peronospora, geni ad effetto maggiore sono stati identificati e già introdotti in nuove varietà (Tourvieille de Labrouhe et al., 2008). Anche nel caso della ruggine sono stati identificati geni di resistenza completa razza-specifici, ma la rapidità con la quale il patogeno evolve e genera nuove varianti limita la disponibilità di ibridi commerciali con ampio spettro di resistenza (Lawson et al., 1998).

1.2 LA QUALITA' FISIOLOGICA DEL SEME

1.2.1 IL VIGORE DEL SEME

Il vigore del seme è stato definito come la somma di tutte quelle proprietà che determinano "il potenziale per un'emergenza e uno sviluppo rapidi e uniformi di un germinello normale in un ampio spettro di condizioni di campo" (McDonald, 1980). Questa definizione evidenzia come il vigore sia percepito come un aspetto fondamentale della qualità del seme e non sia una singola proprietà misurabile, ma un concetto riconducibile a diversi aspetti della performance di un lotto di seme: percentuale e uniformità di germinazione, capacità del seme di germinare in condizioni ambientali sfavorevoli e vitalità dopo conservazione prolungata (Powell, 2006). La longevità è una componente importante del vigore che dipende dalle

caratteristiche genetiche e fisiologiche del seme e dalle condizioni in cui avviene la conservazione (Rajjou et al., 2011).

Per i semi ortodossi il vigore è acquisito gradualmente durante la fase finale della loro maturazione sulla pianta ed è progressivamente perso a partire dalla raccolta e lavorazione e poi gradualmente nel corso della conservazione. Durante lo sviluppo, il raggiungimento del massimo vigore in genere coincide con la maturità fisiologica (massimo peso secco), e si verifica prima che il seme raggiunga lo stadio di raccolta (13-15% di UR).

1.2.2 PERDITA DEL VIGORE: DETERIORAMENTO

La perdita del vigore si riferisce alla riduzione dell'abilità del seme di svolgere tutte quelle funzioni fisiologiche che gli permettono una buona performance di germinazione. Questo processo, detto deterioramento, implica una serie di alterazioni cellulari, metaboliche e chimiche, tra cui la perdita dell'integrità delle membrane e l'incapacità di sintetizzare nuove macromolecole o di stabilizzare quelle preesistenti (Mc Donald, 1999). La rapidità con la quale queste modificazioni biochimiche avvengono dipende da vari elementi: fattori genetici, effetti materni e condizioni fisiologiche alla raccolta, quali peso, dimensioni e maturità del seme (Perry, 1984). In aggiunta a questi fattori intrinseci, che possiamo definire qualità del seme, la longevità del seme è influenzata anche da fattori ambientali, quali trattamenti post raccolta, condizioni di conservazione e organismi nocivi.

Semi di specie diverse, sottoposti alle stesse condizioni di conservazione perdono vitalità a un tasso molto diverso in relazione alle loro differenze di composizione chimica, caratteristiche genetiche e fisiologiche. Alcune

famiglie tendono ad avere semi molto longevi, quali le Malvaceae e le Chenopodiaceae, altre poco longevi, quali le Apiaceae e le Brassicaceae (Walters et al., 2005). Uno studio recente (Nagel e Borner, 2009), mirato a determinare, per alcune specie di interesse agrario, il periodo di dimezzamento della vitalità (P_{50}) a circa 20°C e 50% UR, ha rivelato che i semi di mais, veccia, lupino, cocomero tendono a essere relativamente longevi ($P_{50}>10$ anni), mentre quelli di girasole e lattuga meno ($P_{50}<5$). Inoltre, come già evidenziato da Priestley et al. (1985), semi con elevato contenuto in olio sembrano essere più soggetti al deterioramento. Nello stesso studio, oltre alle differenze interspecifiche, sono stati evidenziati comportamenti differenti tra genotipi diversi all'interno della stessa specie nel caso di lupino, orzo, frumento e mais.

Le condizioni di maturazione sulla pianta madre influenzano marcatamente lo sviluppo del seme, che può essere condizionato da fattori ambientali quali temperatura, fotoperiodo, disponibilità di nutrienti o di acqua nel suolo. In generale, semi che maturano su piante che crescono ad alte temperature mostrano una percentuale e/o un tasso di germinazione maggiore rispetto a quelli che provengono da piante cresciute a basse temperature (Baskin e Baskin, 1998). Gli effetti delle condizioni ambientali durante la maturazione differiscono marcatamente a seconda delle specie, dei genotipi e delle prove (Basra, 1995).

I semi raccolti prima della maturità fisiologica possono essere capaci di germinare, ma il loro vigore può essere compromesso (Tekrony e Egli, 1997). Se la raccolta è posticipata la qualità del seme può declinare a causa delle avverse condizioni ambientali quali eccessi di temperatura, umidità,

piogge, eccessivo disseccamento, attacco da parte di patogeni o animali (Copeland e McDonald, 1995).

È generalmente riconosciuto che semi di dimensioni maggiori hanno emergenza più rapida in campo e producono plantule più vigorose di quelli piccoli, a causa della maggiore quantità di riserve accumulate (Chastain et al., 1995; Ahmad, 2001; Stougaard e Xue, 2004).

I semi generalmente sono raccolti a un contenuto di umidità relativa elevato e devono essere essiccati artificialmente prima della conservazione. Se il processo di asciugatura è eccessivamente lento la qualità del seme può essere compromessa da processi deteriorativi; d'altra parte se è troppo veloce possono essere danneggiati dal disseccamento (Ellis e Roberts, 1980). Inoltre il tipo di raccolta, la pulitura meccanica, e il trasporto possono provocare danni meccanici ai semi.

Il deterioramento è un processo naturale, relativamente lento e asincrono rispetto a una popolazione di semi: per studiarne gli effetti in laboratorio si sottopongono i semi a condizioni controllate che cercano di riprodurre le cause naturali della perdita di vigore e accelerano i processi deteriorativi, essenzialmente temperatura ($>35^{\circ}\text{C}$) e umidità relativa ($>75\%$) elevate. Tra questi trattamenti l'invecchiamento accelerato (*accelerated aging*; Delouche e Baskin, 1973) e il deterioramento controllato (*controlled deterioration*; Powell e Matthews, 1981), sono correntemente usati per stabilire rapidamente la qualità del seme ed esistono procedure standardizzate a livello internazionale per la loro applicazione (ISTA, 2012).

1.2.3 DETERIORAMENTO DURANTE LA CONSERVAZIONE

L'obiettivo della conservazione del seme è di preservarne la vitalità per periodi variabili in relazioni alle sue diverse utilizzazioni. A questo proposito occorre precisare che, anche se dal punto di vista fisiologico un seme è da considerarsi vitale finché contiene tessuti vitali ed è capace di germinare, dal punto di vista sementiero, la vitalità si riferisce anche alla capacità produrre una plantula normale.

I principali fattori che durante la conservazione influenzano la longevità del seme sono la temperatura, l'umidità relativa e la pressione di ossigeno. Nella maggioranza delle specie per le quali la maturità fisiologica del seme è raggiunta dopo una fase di disseccamento (semi ortodossi) la longevità aumenta al decrescere di tutti questi tre fattori (Abdalla e Roberts, 1968 ; Walters, 2004 ; Walters et al., 2004).

Secondo una regola pratica molto applicata (Harrington, 1972), la capacità di conservazione dei semi ortodossi raddoppia per ogni decremento dell'1% del loro contenuto idrico (nell'ambito 5 -14%) e per ogni decremento di 5°C nella temperatura di conservazione (nell'ambito 0-50°C). Nel caso in cui una elevata umidità relativa del seme sia associata a una bassa temperatura di conservazione si possono però verificare danni da congelamento, mentre semi portati a una umidità relativa troppo bassa sono soggetti a danneggiamento durante l'imbibizione (Powell e Matthews, 1978). Nella pratica comune della conservazione a breve termine, per la maggior parte delle specie ove possibile si utilizzano temperature inferiori a 20°C; per i cereali il contenuto idrico non deve superare l'11%, mentre per i semi oleosi è necessario portare il contenuto idrico al di sotto del 7%

1.2.4 PROCESSI DI DETERIORAMENTO

Una volta acquisita la tolleranza al disseccamento, i semi ortodossi sono in grado di sopravvivere nello stato quiescente per un lungo periodo. Questa caratteristica li rende capaci di superare condizioni climatiche avverse, consentendone la dispersione nell'ambiente, il mantenimento della popolazione nella stagione successiva e la conservazione della diversità genetica nel lungo periodo.

Tuttavia durante questa fase il seme deve far fronte a una serie di stress in relazione alla perdita d'acqua che comporta alterazioni fisiche e fisiologiche nella cellula. Un primo aspetto dei danni dovuti alla perdita d'acqua sono le modificazioni delle membrane cellulari, che si contraggono e si impacchettano, portando a una perdita di funzione o a una permeabilità alterata. Per proteggersi da questo danno il citoplasma dei semi quiescenti entra in un "stato vetroso" (*glassy state*) nel quale l'elevata viscosità e la bassa mobilità molecolare rallentano il procedere delle reazioni chimiche (Burke, 1986), incrementando allo stesso tempo la stabilità enzimatica e prevenendo cambiamenti conformazionali delle proteine (Chang et al., 1996; Prestrelski et al., 1993).

La perdita d'acqua inoltre è associata all'accumulo di radicali liberi e alla perossidazione lipidica (Smirnoff, 1993; Côme e Corbineau, 1996). Molti studi, in piante e animali, sottolineano il ruolo centrale dei radicali liberi nell'invecchiamento cellulare e alcuni suggeriscono che la produzione incontrollata di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sia alla base dei processi deteriorativi del seme (Bailly et al., 1996; Kibinza et al., 2006; Kranner et al., 2006). Per "stress ossidativo" si intende l'accumulo di molecole quali

l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), il radicale idrossile ($\bullet OH$) e il perossido di idrogeno (H_2O_2). Nel seme le ROS vengono prodotte in vari compartimenti cellulari, a partire dalla fase di disseccamento, durante la conservazione e fino alla germinazione. La tossicità delle ROS è dovuta alla loro elevata reattività nei confronti delle biomolecole, in particolare acidi nucleici, proteine e lipidi (Walters, 1998; Apel e Hirt, 2004).

A livello del DNA il danno ossidativo può portare alla rottura dei singoli filamenti causata dall'attacco diretto allo scheletro zucchero-fosfato, o mediante modificazione covalente di una base (Bray e West, 2005). Le modificazioni ossidative del DNA possono portare anche a cambiamenti di metilazione delle citosine, alterando così l'espressione genica (Halliwell, 2006). A livello del proteoma lo stress ossidativo si traduce nella carbonilazione delle proteine, che avviene mediante l'attacco diretto ad alcuni residui (Lys, Arg, Pro o Thr), e può aumentare la suscettibilità alla proteolisi (Dunlop et al., 2002). È stato dimostrato, infatti, che derivati carbonilici si accumulano nelle proteine in relazione all'invecchiamento (Yin e Chen, 2005), e in *Arabidopsis* a seguito di deterioramento controllato (Rajjou et al., 2008). Un'altra modificazione irreversibile coinvolge gli amminoacidi contenenti zolfo Cys e Met particolarmente suscettibili all'ossidazione ad acido cisteico e sulfenico (Ghezzi e Bonetto, 2003). Gli acidi grassi polinsaturi infine sono particolarmente sensibili all'attacco da parte del radicale ossidrilico che porta alla propagazione di catene di radicali liberi, in un processo noto come perossidazione lipidica (Bewley, 1986). La perossidazione lipidica comporta la degradazione degli acidi grassi polinsaturi di membrana e delle riserve lipidiche nei semi oleosi, generando

radicali liberi che a loro volta possono attaccare altre componenti cellulari (Bailly, 2004).

Relativamente alla loro origine, si ritiene è improbabile che nei semi quiescenti le ROS derivino da processi metabolici, benché sia stato dimostrato che un metabolismo residuo può essere mantenuto in limitate zone idratate (Leubner-Metzger, 2005). Data la ridotta attività enzimatica in questa fase, si ritiene pertanto che le ROS derivino da reazioni non enzimatiche come l'autossidazione lipidica e la reazione di Amadori e Maillard (Sun e Leopold, 1995). La reazione di Maillard si riferisce a una serie di complesse reazioni non enzimatiche che comportano l'aggregazione e l'insolubilizzazione delle proteine, e si traducono quindi in una perdita di funzionalità del proteoma che contribuisce al deterioramento (Murthy e Sun, 2000).

I processi ossidativi che hanno luogo durante la conservazione sono stati spesso associati alla perdita di germinabilità o di longevità del seme (Priestly et al., 1985; Hendry., 1993; McDonald., 1999). In questa fase la perossidazione lipidica e la conseguente proliferazione di radicali liberi è considerata la causa maggiore del deterioramento (Bewley, 1986; Bailly, 2004). In particolare la perdita di vitalità viene attribuita all'azione deleteria delle ROS associata alla perdita dei meccanismi antiossidanti, che sfocia in una incontrollata presenza di specie reattive dell'ossigeno al momento dell'imbibizione. Questo modello è supportato da studi su varie specie (Kibinza et al., 2006; Rao et al., 2006; Cakmak et al., 2010).

Nella fase di reidratazione, quando il metabolismo viene riattivato e le interazioni molecolari favorite, potenzialmente tutti i compartimenti cellulari

sono fonte di ROS, attraverso il catabolismo dei lipidi (perossisomi), la respirazione cellulare (mitocondri), la fotosintesi (cloroplasto), l'attività della NADPH ossidasi (membrana citoplasmatica), l'attività delle perossidasi (parete cellulare) o il citocromo P450 (citosol) (Sun e Leopold, 1995; Vranovà et al., 2002; Apel e Hirt, 2004). Bisogna tuttavia ricordare che, durante la germinazione, le ROS possono anche fungere da molecole segnale. Per esempio le ROS prodotte nell'apoplasto possono essere coinvolte nella degradazione della parete cellulare (Müller et al., 2009), nella difesa dai patogeni e nella regolazione della germinazione (Schopfer et al., 2001; Kranner et al., 2010a).

Per limitarne la proliferazione delle ROS, nel seme sono presenti sistemi enzimatici, quali gli enzimi detossificanti, e non-enzimatici, quali le molecole antiossidanti (Bailly, 2004).

1.2.5 TRATTAMENTI INVIGORANTI: "OSMOPRIMING"

Con il termine *priming* si indicano trattamenti di idratazione controllata al seme quiescente volti a migliorarne le prestazioni, e utilizzati talvolta per limitare i danni del deterioramento. In generale questi trattamenti producono una maggiore uniformità di emergenza del lotto di seme e aumentano la capacità di germinare in condizioni sfavorevoli (Heydecker e Coolbear, 1977; Bradford, 1986). Questi benefici derivano dal fatto che l'idratazione controllata permette l'avvio di eventi del metabolismo germinativo, senza tuttavia determinare la protrusione della radichetta.

L'assorbimento dell'acqua avviene in tre fasi. La prima, prevalentemente passiva, consiste in una rapida imbibizione dovuta al basso potenziale idrico

di matrice del seme secco. Nella seconda, (fase stazionaria), il potenziale idrico del seme è in equilibrio con l'ambiente circostante; è in questa fase che avvengono i principali eventi metabolici che preparano l'embrione alla germinazione, cioè alla fuoriuscita della radichetta dal tegumento, che segna l'avvio della terza fase (sviluppo eterotrofo della plantula). Il *priming* consiste essenzialmente in un prolungamento controllato della seconda fase impedendo il normale assorbimento di acqua che determinerebbe la geminazione (Halmer, 2006). Nel caso dell'*osmopriming* l'assorbimento di acqua viene limitato facendolo in una soluzione a basso potenziale idrico a base di mannitolo, sali inorganici (KNO_3 , KCl , K_3PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) o polietilene glicole (PEG). Quest'ultimo, comunemente usato nella frazione molecolare di 6000-8000, è attualmente preferito, in quanto la grandezza molecolare previene i danneggiamenti dovuti alla penetrazione del soluto nelle cellule. Il trattamento in genere dura da meno di 1 a 14 giorni, durante i quali i semi sono mantenuti tra 15° e 25°C. In seguito al trattamento i semi per essere conservati devono essere riportati a un contenuto idrico minore mediante asciugatura. Questo passaggio, essenziale a fini commerciali, in alcuni casi è però deleterio, in quanto può determinare una riduzione della germinabilità.

Come accennato sopra, si ipotizza che i benefici di questo trattamento derivino dall'attivazione di parte del ciclo cellulare, e in particolare di alcuni processi di riparazione. Studi su porro e mais riportano sintesi proteica e DNA a bassi livelli durante l'*osmopriming*, ma nessuna indicazione di divisione nucleare (Bray et al., 1989; Cruz-García et al., 1995). Ciò indica che le cellule siano bloccate nella fase G1 e che non si raggiungono le

condizioni di germinazione adeguate in quanto l'osmolarità della soluzione riduce la disponibilità d'acqua.

1.2.6 MECCANISMI DI TOLLERANZA AL DETERIORAMENTO: SISTEMI ANTIOSSIDANTI E DI RIPARAZIONE

Diversi meccanismi cellulari e biochimici sembrano essere associati alla tolleranza al deterioramento, molti dei quali sono direttamente coinvolti nella detossificazione o nella riparazione del danno ossidativo; essi includono l'accumulo di oligosaccaridi, la sintesi delle "proteine della tarda embriogenesi" (*late embryogenesis abundant*, LEA) e delle proteine "heat shock" (HSP), e l'attivazione di sistemi antiossidanti (Wehmeyer et al., 1996; Bailly et al., 2001; Bailly et al., 2004; Shih et al., 2008). Inoltre le cellule sono dotate di meccanismi di riparazione delle proteine e del DNA, che contribuiscono a mantenere una elevata longevità del seme (Rajjou e Debeaujon, 2008).

La germinazione del seme in un certo senso dipende dai meccanismi di riparazione poiché gli acidi nucleici, le proteine e i lipidi sono inevitabilmente soggetti a un certo grado di stress ossidativo sia nel corso della fase di disseccamento durante la maturazione, sia per i processi di deterioramento dovuti alla conservazione (Kranter et al., 2010b; Bailly et al., 2008; Rajjou e Debeaujon, 2008).

1.2.6.1 DISACCARIDI E OLIGOSACCARIDI

La stabilità delle membrane durante il disseccamento e il deterioramento è stata associata alla presenza di saccarosio e oligosaccaridi che contribuirebbero a mantenere la struttura del doppio strato fosfolipidico

nella fase di disseccamento. Secondo l'ipotesi di "water replacement" i disaccaridi interagiscono direttamente con il fosfato delle teste polare dei fosfolipidi prevenendo l'aggregazione delle molecole vicine durante la disidratazione (Crowe et al., 1987; 1992). Molti studi inoltre indicano che gli zuccheri solubili, in particolare gli oligosaccaridi della famiglia del raffinosaio, potrebbero essere coinvolti nella protezione dagli effetti deleteri del disseccamento e/o deterioramento, suggerendo un loro ruolo nella longevità del seme (Obendorf, 1997; Bailly et al., 2001)..

In girasole saccarosio e raffinosaio sono gli unici zuccheri solubili presenti nei cotiledoni nella fase di disseccamento; inoltre la quantità di raffinosaio raddoppia nel seme maturo, influenzando il *glassy state* (Lehner et al., 2006).

1.2.6.2 PROTEINE LEA

Le LEA sono una famiglia numerosa di proteine che si accumulano nella fase finale della maturazione del seme, quando l'embrione acquisisce tolleranza al disseccamento (Dure, 1993), o durante eventi di carenza d'acqua negli organi vegetativi. Questo quadro suggerisce che abbiano un ruolo protettivo nello stress da disidratazione anche se la loro funzione precisa rimane sconosciuta (Battaglia et al., 2008). Le caratteristiche peculiari di questa classe di proteine sono la presenza di motivi ripetuti nella sequenza proteica, l'elevata idrofilicità e solubilità, la termostabilità e l'apparente mancanza di una struttura definita (Hoekstra et al., 2001). In base alla presenza di motivi condivisi le LEA sono state classificate in sei gruppi. Tra questi il gruppo II, che comprende le deidrine è quello che ha ricevuto maggiore attenzione. Tuttavia, nonostante siano stati proposti meccanismi

per giustificare il loro contributo, quali la stabilizzazione di molecole e membrane (Campbell e Close, 1997) e l'interazione con gli oligosaccaridi nella formazione del *glassy state* (Shih et al., 2004), il loro ruolo specifico non è del tutto chiarito.

In girasole l'espressione della deidrina codificata dal gene *HaDhn1* risponde allo stress idrico in pianta (Ouvrard et al., 1996) e l'aumento dei relativi trascritti è correlato alla resistenza alla siccità (Cellier et al., 1998). Inoltre nell'ultima fase dello sviluppo dell'embrione, la risposta allo stress idrico sembra seguire una via ABA indipendente in quanto *HaDhn1* si esprime allo stesso modo sia nel *wild type* che nel mutante ABA-deficiente (Giordani et al., 1999).

1.2.6.3 PROTEINE "HEAT SHOCK"

Le HSP funzionano come *chaperon* molecolari, ovvero agiscono *in vivo* per assicurare il corretto ripiegamento ed assemblaggio di proteine cellulari (Ellis, 1993) in strutture più complesse, minimizzando l'aggregazione di proteine non native, e rendendo riconoscibili per la degradazione i polipeptidi danneggiati (Feder e Hoffmann, 1999). HSP a basso peso molecolare (sHSP; PM <30 kDa) prodotte in risposta alle alte temperature e ad altri stress abiotici, quali presenza di metalli pesanti, stress ossidativo o da freddo (Sun et al., 2002; Gulli et al., 2005), sono state associate alla tolleranza al disseccamento in assenza di shock termico (Almoguera e Jordano, 1992; Coca et al., 1994; DeRocher e Vierling., 1994; Wehmeyer et al., 1996).

Una evidenza del ruolo di queste proteine nella tolleranza al deterioramento del seme in girasole è stata ottenuta facendo sovra-esprimere in tabacco,

mediante transgenesi, un fattore di trascrizione di *Helianthus* (*HaHSFA9*), che ha favorito l'accumulo di sHSPs ed aumentato la germinabilità dopo invecchiamento accelerato (Prieto-Dapena et al., 2006).

1.2.6.4 SISTEMI E MOLECOLE ANTIOSSIDANTI

Le cellule vegetali sono dotate di meccanismi enzimatici e non enzimatici che permettono l'eliminazione delle ROS. La superossido dismutasi (SOD) ad esempio, che tramuta l'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno (Bowler et al., 1992), è presente nella forma citosolica, mitocondriale o cloroplastica. Il perossido di idrogeno, invece, può essere eliminato dall'azione della catalasi (CAT), localizzata prevalentemente nei gliossisomi e nei perossisomi (Willekens., 1995). Anche gli enzimi che fanno parte del ciclo dell'ascorbato-glutatione partecipano a limitare le ROS. Essi comprendono l'ascorbato perossidasi (APX) la monodeidroascorbato reductasi (MDHAR), la deidroascorbato reductasi (DHAR), e la glutazione reductasi (GR); sono presenti in citoplasma, cloroplasto, mitocondri, perossisomi e apoplasto. e partecipano alla rigenerazione degli antiossidanti acido ascorbico, glutazione ridotto e α -tocoferolo (Mittler., 2002; De Tullio e Arrigoni, 2003). La glutazione perossidasi (GPX) può inoltre catalizzare direttamente la riduzione di H_2O_2 e idroperossidi (Eshdat et al., 1997). Nei semi inoltre sono presenti altre molecole con funzione antiossidante quali polifenoli, flavonoidi e perossiredossine, perossidasi tiolo-dipendenti capaci di ridurre H_2O_2 e OH^\bullet (Aalen, 1999).

Molti studi hanno dimostrato che l'acquisizione della tolleranza al disseccamento è correlata all'aumento della capacità antiossidante, sia durante la fase di maturazione del seme, che in piante tolleranti al

disseccamento (Bailly et al., 2001; Kranner et al., 2002). In particolare, semi ortodossi di fagiolo durante la maturazione mostrano elevata attività di CAT e GR, mentre le attività di APX e SOD decrescono (Bailly et al., 2001). L'incremento di attività di CAT in questa fase è documentata in altre specie compreso il girasole (Kunce e Trelease., 1986; Scandalios et al., 1997; Bailly et al., 2003) mentre sulla GR e SOD non ci sono indicazioni univoche. Nei semi quiescenti e nelle primissime fasi dell'imbibizione, quando l'accessibilità degli enzimi al loro substrato è limitata, la produzione incontrollata di ROS è probabilmente limitata da molecole antiossidanti, quali il glutatione ridotto e le perossiredossine (Kranner e Grill, 1993; De Vos et al., 1994; Stacy et al., 1999). In varie specie, invece, vi sono evidenze che durante la germinazione il controllo dell'omeostasi redox è espletato dall'insieme di antiossidanti ed enzimi, come si evince dall'accumulo di α -tocoferolo, flavonoidi, perossiredossine, acido ascorbico, glutatione ridotto e dall'incremento dell'attività della catalasi (Tommasi et al., 2001; Yang et al., 2001; Bailly et al., 2002; Gallardo et al., 2002; Guan e Scandalios, 2002).

In girasole, l'incremento dell'attività catalasica durante il disseccamento del seme porta a una minore perossidazione lipidica, suggerendo la rilevanza dell'azione detossificante di questo enzima (Bailly et al., 2003, 2004). In semi sottoposti ad invecchiamento accelerato, inoltre, si osserva una relazione diretta tra la ridotta attività di questo enzima e l'aumento della perossidazione lipidica durante il deterioramento, a sottolineare l'importanza del controllo dello stress ossidativo per il mantenimento del vigore del seme (Bailly et al., 1996, 2002).

1.2.6.5 MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

È noto da tempo che nei semi imbibiti (fase 2 della germinazione) avvengono processi di riparazione del DNA mirati a ridurre gli effetti dell'insorgenza di mutazioni e che questi siano necessari alla divisione cellulare che avviene nelle fasi successive (Bewley, 1986).

Nel seme secco di varie specie la maggior parte delle cellule embrionali è nella fase G1 (Bewley e Black 1994) e con l'imbibizione si ha la riattivazione del metabolismo cellulare. Questo passaggio tuttavia non è immediato: devono passare alcune ore prima che la replicazione del DNA (fase S) diventi evidente (Vázquez-Ramos e Sánchez, 2003). Questo periodo di transizione deriva dal bisogno della cellula di riparare i danni, in particolare agli acidi nucleici, accumulati durante il disseccamento e la conservazione (Osborne, 1983). In seguito ad invecchiamento accelerato il tempo medio di germinazione aumenta, probabilmente in relazione all'accrescimento dell'entità del danno molecolare, e del tempo necessario a ripararlo. Diversi studi hanno evidenziato, infatti, una correlazione diretta tra il grado d'invecchiamento e il tempo richiesto per l'inizio della replicazione (Sen e Osborne, 1974, Elder et al., 1987; Gutierrez et al., 1993).

I danni al DNA in genere si traducono in fratture del singolo o del doppio filamento sia in maniera diretta, mediante la distruzione dello scheletro zucchero-fosfato, sia indirettamente attraverso il meccanismo di riparazione per escissione. Queste lesioni vengono riparate dalle DNA ligasi. Recentemente è stato dimostrato in *Arabidopsis* che la DNA LIGASE IV (AtLIG6) è importante nel garantire la vitalità e il vigore del seme in caso di condizioni di germinazione non ottimali, come l'invecchiamento accelerato e

l'esposizione ad agenti genotossici (Waterworth et al., 2010). Altre vie di riparazione del DNA operative nei semi includono la riparazione di un *mismatch* (*MisMatch Repair*), la riparazione mediante escissione di una base (*Base Excision Repair*) o la riparazione mediante escissione di un nucleotide (*Nucleotide Excision Repair*), dove il filamento complementare agisce come uno stampo (Bray e West, 2005). Il meccanismo di riparazione dei *mismatch* è altamente conservato tra le specie e corregge la maggior parte degli errori che rimangono dopo l'attività di *proofreading* della polimerasi, riducendo il tasso di incorporazione errata di nucleotidi nella nascente catena di DNA (Leonard et al., 2003). Recentemente è stato dimostrato come una polimerasi (ADP-ribosio), essenziale al meccanismo di riparazione BER, sia necessaria per la germinazione (Hunt et al., 2007). Il meccanismo NER avviene tramite il riconoscimento indiretto della mutazione attraverso il cambiamento conformazionale della doppia elica, a cui segue la rimozione di 24-32 basi contenenti la modificazione, ed è catalizzata da un complesso di sei multiproteine. In *Arabidopsis* mutanti deficienti per una delle proteine che riconoscono la base mutata o per una componente elicastica risultano rispettivamente in un fenotipo ipersensibile alle ROS (Costa et al., 2001) o letale (Liu et al., 2003). L'importanza dei meccanismi di riparazione del DNA è testimoniata anche da uno studio condotto in mais: mutanti per una proteina (Rad51) coinvolta nel corretto appaiamento cromosomico e nella riparazione delle rotture della doppia elica, sono risultati vitali, ma caratterizzati da una ridotta produzione di seme (Li et al., 2007).

1.2.6.6 MECCANISMI DI RIPARAZIONE DELLE PROTEINE

È ben documentato che i semi maturi contengono mRNA preformati, detti "*long-lived*" per indicare la loro capacità di "sopravvivere" al disseccamento e permanere negli embrioni quiescenti, insieme a proteine funzionali alla trascrizione, alla traduzione e al metabolismo (Bewley e Black 1994). Gli mRNA del seme quiescente sono poi tradotti nelle primissime fasi dell'imbibizione per esplicare la loro funzione (Comai et al., 1989; Hughes e Galau, 1989, 1991). Alcuni autori suggeriscono che gli mRNA presenti nel seme secco maturo, siano sufficienti per l'istaurarsi della germinazione *sensu strictu*, sottolineando come il potenziale per la germinazione sia in gran parte costituito durante la fase di maturazione. Rajjou et al. (2004) riportano infatti che la germinazione in *Arabidopsis* è bloccata in presenza di inibitori della sintesi proteica (cicloesimide), mentre può avvenire in presenza di inibitori trascrizionali (α -amanitina). Il tasso e l'uniformità di germinazione risultano tuttavia ridotti, indicando che nuovi trascritti devono essere prodotti durante l'imbibizione per ottenere un elevato vigore del seme (Rajjou et al., 2004). Le proteine presenti nel seme quiescente infatti, oltre a essere fonte di aminoacidi durante le prime fasi della germinazione (proteine di riserva), sono importanti per la produzione di energia e sono coinvolte nella replicazione, nella traduzione degli mRNA preesistenti e nella trascrizione. È evidente perciò l'importanza del mantenimento dell'integrità del proteoma durante le fasi di conservazione del seme. Queste macromolecole infatti sono gradualmente danneggiate durante la fase di conservazione, e ciò si traduce in una perdita di vigore e di vitalità del seme (Orzac et al., 2007). L'importanza del mantenimento dell'integrità

funzionale delle proteine è testimoniata dal fatto che il cambiamento del proteoma, in seguito a deterioramento controllato in *Arabidopsis*, corrisponde a una perdita di vigore (Rajjou et al., 2008). In particolare il deterioramento controllato provoca un aumento della carbonilazione delle proteine. Questa reazione è ampiamente utilizzata come indicatore di stress ossidativo in quanto è dimostrato come possa inficiare l'attività enzimatica o aumentare la suscettibilità alla proteolisi (Drake et al., 2002; Bassette et al., 2002; Nguyen e Donaldson, 2005).

Durante la fase di disseccamento inoltre, le proteine sono suscettibili a processi di denaturazione, oppure alla degradazione chimica spontanea di residui di asparagina e acido aspartico, che porta all'accumulo di residui anormali di isoaspartile. La presenza di questi residui di isoaspartile può portare perdita della funzionalità proteica o dell'attività catalitica delle proteine modificate (Johnson et al., 1997; George-Nascimento et al., 1990). Questo tipo di danno alle proteine, tuttavia, può essere riparato dalla L-isoaspartil metiltransferasi, enzima che catalizza il primo passaggio che porta alla riconversione nel peptide normale, e la cui attività nei semi di *Arabidopsis* è risultata coinvolta nel vigore del seme (Ogè et al., 2008).

Possiamo ritenere dunque che il seme durante la germinazione abbia due opzioni per mantenere i suoi tessuti vitali: 1) avere a disposizione un set di proteine preesistenti funzionali 2) utilizzare mRNA preesistenti dai quali tradurre *de novo* proteine funzionali. Sembra tuttavia che, in ogni caso, la perdita della prima opzione, che implica la mancanza di proteine essenziali alla traduzione, porti automaticamente a perdere anche la seconda (Chen et

al., 2010). Da ciò si evince l'importanza di mantenere un proteoma funzionale per ottenere una completa germinazione.

1.3 L-ISOASPARTIL O-METILTRANSFERASI (PIMT)

1.3.1 MECCANISMO DI RIPARAZIONE PROTEICA

La proteina L-isoaspartil O-metiltransferasi (PIMT: E.C.2.1.1.77) è un enzima altamente conservato, presente in un vastissimo *range* di organismi che comprende batteri gram-negativi, piante, invertebrati e vertebrati, incluso l'uomo (Kagan et al., 1997a). Appartiene alle O-metiltransferasi (OMTs) che, insieme alle N- e alle C- sono tre delle maggiori famiglie di metiltransferasi, classificate in base alla natura chimica del substrato (Roje et al., 2006). La maggior parte delle O-metiltransferasi conosciute agisce su un residuo carbossile o idrossile di piccole molecole. La L-isoaspartil O-metiltransferasi è un enzima di riparazione la cui funzione è quella di limitare il danno alle proteine indotto dall'accumulo di residui anormali di isoaspartile, derivanti dalla degradazione chimica spontanea dei residui di asparagina e acido aspartico (Lowenson e Clarke, 1992). PIMT catalizza il trasferimento di un gruppo metile ai residui proteici di L-isoaspartile (isoAsp), e in alcuni casi di D-aspartile, facendo iniziare il meccanismo che porta alla loro riconversione in residui normali (McFadden e Clarke, 1987). In questa reazione l'isoAsp è temporaneamente metilesterificato al gruppo α -carbossilico, attraverso una reazione dipendente dalla S-adenosil metionina (AdoMet; Aswad et al., 2000). Dopo aver donato un gruppo metile l'AdoMet si trasforma in S-adenosil omocisteina (AdoHcy) che è

ritenuto un inibitore della reazione (Perna et al., 1995). Per idrolisi spontanea del gruppo metilesterificato successivamente si forma un anello L-succinimidico (Aswald, 1984; Murray e Clarke, 1984), il quale a sua volta spontaneamente idrolizza al gruppo α o β carbossile, producendo un insieme di residui di L-isoaspartile e L-aspartile in un rapporto di 3:1 (Grappin et al., 2011). Anche se molte isoforme dell'enzima sono state descritte in vari organismi, si ritiene che in genere un singolo gene codifichi per questa proteina negli Eucarioti (Kagan et al., 1997a). Ad oggi, infatti, l'unico organismo nel quale sono state identificate due copie del gene è *Arabidopsis* (Xu et al., 2004).

1.3.1.1 STRUTTURA PROTEICA E CATALISI ENZIMATICA

La prima struttura cristallografica di PIMT è stata risolta da Skinner et al. (2000) per l'enzima del batterio ipertermofilo *Thermatoga maritima*. La struttura predetta per questo modello è di tipo "Rossmann fold" modificato, e consiste in sette foglietti β , connessi da α -eliche. In PIMT, il foglietto β centrale ha una topologia unica $3\uparrow 2\uparrow 1\uparrow 4\uparrow 5\uparrow 6\downarrow 7\uparrow$, in quanto nelle altre metiltransferasi AdoMet-dipendenti, attive su diversi substrati, ha una topologia $3\uparrow 2\uparrow 1\uparrow 4\uparrow 5\uparrow 7\downarrow 6\uparrow$ (Martin e McMillan, 2002; Schubert et al., 2003). Simili strutture di tipo $\alpha\beta\alpha$, sono state successivamente identificate negli ortologhi di PIMT rinvenuti in *Pyrococcus furiosus* (Griffit et al., 2001), *Sulfolobus tokodaii* (Tanaka et al., 2004), *Drosophila melanogaster* (Bennet et al., 2003), *Escherichia coli* (Fang et al., 2010) e nell'uomo (Weise et al., 2002; Ryttersgaard et al., 2002), in accordo con la grande conservazione evolutiva della struttura proteica. Un elevato grado di conservazione si ritrova anche a livello di sequenza: Kagan et al. (1997a) hanno, infatti,

calcolato per PIMT un tasso di mutazione tra specie molto basso, simile a quello delle proteine della famiglia del citocromo b5 e della lattato deidrogenasi.

L'elevato grado di somiglianza del gene codificante per la isoaspartil metiltransferasi insieme alla sua diffusa presenza nei vari *phyla*, ci indica l'importanza del ruolo svolto da questo enzima. La sequenza amminoacidica dedotta nel batterio ipertermofilo *T. maritima* può essere divisa in tre domini funzionali: una porzione N-terminale (77 residui) denominata "*East Rim*", un dominio centrale (137 residui) denominato "*West Rim*" e un dominio C-terminale (102 residui) (Skinner et al., 2000); negli organismi superiori quest'ultimo dominio è molto ridotto (per esempio 9 aminoacidi nell'uomo; Smith et al., 2002). La "*East Rim*" contiene la Pre-region I (TISAPHMHA), uno dei due motivi caratteristici delle isoaspartil metiltransferasi, mentre il secondo (Post-region III, RYVPLT) è localizzato nella "*West Rim*" (Skinner et al., 2000). Il ruolo di queste due regioni potrebbe essere legato al mantenimento della specificità del substrato (Kagan et al., 1997a) in quanto il sito attivo è incastonato tra la porzione N-terminale e il dominio centrale (Skinner et al., 2000). In particolare questi autori suggeriscono che, almeno in *T. maritima*, le catene laterali di Thr-57 e Ser-59 nella Pre-region I, siano elementi chiave per il riconoscimento selettivo del substrato isoaspartile dai normali residui di aspartile. Bennet et al. (2003) hanno dimostrato che, d'altra parte, per una corretta attività catalitica in *D. melanogaster* è necessaria la presenza del residuo Ser-60; sostituendo infatti questo residuo con Thr, Gln, o Ala, mediante mutagenesi sito-specifica, si altera l'affinità dell'isoaspartil metiltransferasi per il

substrato. La minore attività catalitica osservata in generale nei procarioti è stata recentemente messa in relazione, in *Escherichia coli*, alla maggiore affinità di PIMT per la S-adenosil omocisteina dovuta alla presenza di diversi residui coinvolti nelle interazioni idrofobiche con il l'AdoHcy (Fang et al., 2010).

La L-isoaspartil metiltransferasi, inoltre, condivide con la maggior parte delle metiltransferasi AdoMet-dipendenti tre regioni molto conservate, designate come I, II, e III, ritenute necessarie per legare l'AdoMet (Kagan e Clarke, 1994).

1.3.1.2 STRUTTURA DEL GENE E REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE

Nonostante, l'attività isoaspartil metiltransferasica nel regno vegetale sia ben documentata (Shen-Miller et al., 1995; Mudgett et al., 1997; Thapar e Clarke, 2001), il gene codificante PIMT è stato caratterizzato solamente in *Arabidopsis* (*AtPIMT1*, Mudgett e Clarke, 1996; *AtPIMT2*, Xu et al., 2004;), *Triticum aestivum* (*TaPIMT*, Mudgett e Clarke 1993) e *Cicer arietinum* (*CaPIMT1*, Verma et al., 2010).

Nelle piante il gene *PIMT1* è costituito da 4 esoni e tre introni, per un totale di 230 amminoacidi in *Arabidopsis* e frumento, e 229 in cece. La porzione codificante del gene *PIMT2* in *Arabidopsis* è per il 68% identica a *PIMT1*, escludendo la regione di 237 bp in 5', unica e caratterizzante *PIMT2* (Xu et al., 2004). Questa regione infatti contiene un segnale di localizzazione nucleare che fa sì che la localizzazione cellulare di *PIMT2* sia limitata al nucleo, mentre *PIMT1* si trova prevalentemente nel citosol (Xu et al., 2004). L'espressione del gene *PIMT* sembra finemente regolata da stimoli ormonali e ambientali nel corso della maturazione del seme, ma in tutte le specie

analizzate raggiunge l'apice nel seme secco. (Mudgett et al.,1994, 1996; Thapar e Clarke, 2001; Xu et al. 2004;. Dinkins et al., 2008; Verma et al., 2010). In *T. aestivum*, ad esempio, l'espressione di *PIMT* è massima nel seme secco e declina rapidamente con l'imbibizione e la germinazione (Mudgett e Clarke, 1994). Inoltre, durante la maturazione della cariosside l'accumulo dei relativi trascritti si sovrappone al *pattern* di espressione delle LEA. L'attività enzimatica e l'espressione del gene possono poi venire reindotte in germinelli di 5 giorni, a seguito di disidratazione o stress da NaCl, oppure in presenza di acido abscissico (ABA) esogeno (Mudgett e Clarke, 1994). L'induzione dell'espressione del gene *PIMT* a seguito di trattamento con ABA è stata osservata anche in germinelli di *Arabidopsis* (Mudgett e Clarke, 1996; Xu et al. 2004; Ogè et al., 2008) e mais (Thapar et al., 2001). Nel promotore di *AtPIMT1*, infatti, sono stati riscontrati tre elementi regolatori ABA-inducibili ABRE (Mudgett e Clarke, 1996). In *Arabidopsis*, *tuttavia*, stress quali la disidratazione o NaCl, non determinano un accumulo di trascritti di *PIMT*, suggerendo che la regolazione dell'espressione possa essere diversa in specie non affini (Mudgett e Clarke, 1996). Recentemente in cece (Verma et al., 2010) l'espressione di questo gene è risultata indotta anche a seguito di stress ossidativo e termico .

1.3.1.3 LA FORMAZIONE DI ISOSPARTATO DURANTE L'INVECCHIAMENTO CELLULARE

La formazione di isoaspartato rappresenta una delle più importanti alterazioni spontanee deleterie che subiscono le proteine in condizioni fisiologiche e una delle poche reversibili (Clarke, 2003). La suscettibilità alla formazione di isoAsp in un peptide è influenzata dalla struttura proteica

(Robinson e Robinson, 2001) e da fattori ambientali tra cui ph, temperatura (Patel e Borchardt, 1990) e fonti di stress (D'Angelo et al., 2001; Ingrosso et al., 2002; Ladino e O'Connor, 1992). Un ristretto gruppo di proteine contenenti residui di isoAsp, tra cui la calmodulina (Johnson et al., 1987; Dersrosiers et al., 1990) e la tubulina (Najbauer et al., 1996; Lanthier et al., 2002) sono state identificate come substrato di PIMT in cellule e tessuti non vegetali. Recentemente in *Arabidopsis*, mediante *phage display biopanning* (Grappin et al., 2011), sono state identificate 17 proteine bersaglio di questo enzima, tra cui proteine di riserva, peptidi con funzione protettiva, LEA, HSP, e una proteina implicata nel meccanismo di traduzione (Chen et al., 2010).

Studi sui sistemi animali suggeriscono che la formazione di isoAsp, così come la sua conversione in aspartato, possano agire come un orologio molecolare, nel modulare i processi cellulari e il *turnover* proteico (Robinson et al., 1970) mentre più recentemente, si ipotizzano ruoli nel coadiuvare l'apoptosi (Deverman et al., 2002; Kutuk e Letai, 2008; Zhao et al., 2004; 2007), nel rimodellamento della cromatina (Linder et al., 1999) e nella regolazione genica, attraverso il controllo della fosforilazione o della metilazione (Pepperkok et al., 2000). Questi aspetti tuttavia non sono stati documentati nelle piante e necessitano maggiore approfondimento (Grappin et al., 2011).

1.3.1.4 ANALISI FUNZIONALE IN ORGANISMI MODELLO

L'importanza del meccanismo di riparazione svolto da PIMT si evince dal fenotipo di organismi nei quali il gene è stato interrotto o dove la sua espressione è stata incrementata. In *E. coli* il *knock out* del gene riduce la

sopravvivenza nella fase stazionaria in condizioni di stress ossidativo o termico (Visick et al., 1998). In *D. melanogaster* la sovra-espressione costitutiva di PIMT corrisponde a un incremento della vita media in moscerini sottoposti a un lieve shock termico (Chavous, 2001). In *Caenorhabditis elegans* mutanti *knock out* non sopravvivono in condizioni di carenza di nutrienti e hanno una *fitness* ridotta (Kagan et al., 1997b).

1.3.2 IMPLICAZIONI NEL VIGORE DEL SEME

Mudgett et al. (1997), hanno riportato l'attività funzionale di PIMT nell'estratto crudo di 45 specie rappresentanti 23 famiglie di Sporofite e Spermatofite. In queste ultime, livelli simili di attività si osservano in semi di conifere, monocotiledoni e dicotiledoni (Mudgett et al., 1997). Anche se una attività enzimatica PIMT di entità inferiore può essere osservata anche in tessuti vegetativi (Thapar e Clarke, 2001), quella principale si riscontra nei semi dove, durante il disseccamento e la quiescenza, si ipotizza avvengano gran parte dei processi deteriorativi, incluso l'accumulo dei residui anormali di isoaspartile (Mudgett e Clarke, 1993).

Alcuni studi sembrano indicare come l'accumulo di isoAsp sia particolarmente deleterio per la longevità del seme e parallelamente come una limitazione di questa modificazione nel proteoma da parte di PIMT, contribuisca al vigore del seme. Semi di loto (*Nelumbo nucifera*) pluricentenari, ritrovati vitali in Cina, esibiscono livelli molto elevati di attività PIMT (Shen-Miller et al., 1995). In semi di orzo, ad esempio, l'attività di PIMT decresce nel tempo, fino a raggiungere livelli molto bassi dopo 17 anni di conservazione (Mudgett et al., 1997). Tale riduzione si

accompagna, inoltre, a un aumento di residui anormali di isoAsp e a una ridotta vitalità del seme. Nello stesso lavoro, tuttavia, semi di orzo sottoposti ad invecchiamento accelerato, pur mostrando bassa vitalità ed accumulo di isoAsp, non esibiscono un decremento dell'attività enzimatica di PIMT, a indicazione che il livello di attività della metiltransferasi potrebbe non essere sufficiente a riparare tutti i residui danneggiati (Mudgett et al., 1997). In pomodoro al contrario l'invecchiamento accelerato riduce l'attività enzimatica di PIMT ed aumenta il tempo medio di germinazione (Kester et al., 1997); inoltre sottoponendo a *priming* i semi invecchiati artificialmente, i livelli di attività enzimatica e il TMG tornano simili a quelli del seme non invecchiato, suggerendo che il trattamento invigorente potrebbe mitigare gli effetti deleteri dell'invecchiamento con il coinvolgimento di PIMT. L'indicazione forse più probante del coinvolgimento di questo sistema di riparazione nel vigore del seme è stata ottenuta in *Arabidopsis* da uno studio di mutanti sovra-esprimenti o sotto-esprimenti il gene *PIMT1*, ottenuti per transgenesi (Ogè et al., 2008). Rispetto al *wild type* le linee sovra-esprimenti *PIMT1* mostravano un limitato accumulo di isoAsp nella fase di maturazione, suggerendo come una elevata attività enzimatica *in vivo* fosse in grado di riparare i residui alterati (Ogè et al., 2008). Inoltre è stata osservata una correlazione tra longevità del seme, come tolleranza al deterioramento, e accumulo della proteina codificata da *AtPIMT1*: in seguito a deterioramento controllato, infatti, le linee transgeniche sovra-esprimenti il gene, mostravano germinabilità più elevate. D'altra parte nelle linee sotto-esprimenti *AtPIMT1* si osservava una marcata suscettibilità al

deterioramento, con geminabilità inferiore al 30%, rispetto al 70% nel *wild type* (Ogè et al., 2008).

1.4 STUDI GENETICI SUL VIGORE E SULLA RISPOSTA AL PRIMING

Il vigore del seme è un carattere complesso, di natura poligenica e fortemente influenzato da fattori ambientali durante la formazione del seme, la raccolta e la conservazione (Clerkx et al., 2004a). Numerosi studi sono stati condotti per identificare i QTL coinvolti nel vigore e nella longevità del seme sia in *Arabidopsis* (Clerkx et al., 2004b; Joosen et al., 2012) che in altre specie, quali cavolo (Bettey et al., 2000), lattuga (Shwember e Bradford, 2010), pomodoro (Foolad et al., 1999), riso (Jiang et al., 2011), e sorgo (Natoli et al., 2002).

In alternativa all'approccio QTL, in alcuni studi sono stati presi in considerazione geni candidati, al fine di individuare le basi molecolari del vigore. La maggior parte di questi lavori, condotti in *Arabidopsis*, sono basati su mutanti, naturali o ottenuti per trangenese, dei quali è stata valutata, preferenzialmente, l'espressione genica. Ad esempio mutanti nelle vie biosintetiche dei flavonoidi (Debeaujon et al., 2000) o del tocoferolo (Sattler et al., 2004) mostrano una ridotta longevità, in ragione del ruolo protettivo di queste molecole. Bentsink et al. (2006) hanno dimostrato invece che una mutazione nel gene *DOG1*, che controlla la dormienza, è associata con una maggiore longevità in *Arabidopsis*. Semi trangenici che accumulano in quantità maggiore un fattore di trascrizione correlato allo stress termico, mostrano un'elevata presenza di proteine *heat shock* e

resistenza all'invecchiamento accelerato (Prieto-Dapena et al., 2006). Al contrario l'attività di una fosfolipasi D di membrana sembra essere deleteria per la qualità del seme, in quanto l'espressione ridotta è associata qualità fisiologica e longevità più elevate (Devaiah et al., 2007).

In un recente lavoro, Lee et al. (2010) hanno dimostrato che la sovra-espressione di geni della APX e SOD, in semi di tabacco, ha un effetto protettivo dagli effetti dell'invecchiamento. In *Nelumbo nucifera*, Zhou et al. (2010) hanno identificato due geni codificanti per metallotionine (proteine ricche di cisteina che detossificano le ROS) molto espressi nei semi pluricentenari di loto che, quando sovra-espressi in *Arabidopsis* ne potenziano la tolleranza all'invecchiamento accelerato (Zhou et al., 2012).

Infine la sovraespressione della L-isoaspartyl methyltransferase PIMT1 in *Arabidopsis*, potenzia la qualità fisiologica del seme, mentre l'inattivazione del gene ne riduce il vigore, suggerendo che l'abilità nel riparare i residui anormali di isoaspartile sia associata alla longevità (Ogè et al., 2008).

Per identificare possibili *biomarcatori* del vigore un altro approccio possibile è quello di valutare la risposta al trattamento invigorente di *priming*, sul proteoma e sul trascrittoma.

Diversi studi sono stati condotti per comprendere i meccanismi cellulari alla base degli effetti dell'*osmopriming* sulla tolleranza agli stress e il vigore del seme. Questi hanno preso in considerazione aspetti quali la riattivazione del ciclo cellulare, il metabolismo di proteine e carboidrati, i sistemi antiossidanti e i processi di riparazione del DNA e delle proteine, fino a cambiamenti nel trascrittoma e nel proteoma. De Castro et al. (2000) a seguito di *osmopriming* hanno osservato, in tutti i tessuti dell'embrione di

pomodoro, un accumulo di β -tubulina presumibilmente connesso con la riattivazione del ciclo cellulare. Un incremento della 11-S globulina, associata alla mobilizzazione delle proteine di riserva, è stato riportato in semi di *Beta vulgaris* sottoposti a *priming* (Job et al., 1997). Capron et al. (2000) propongono questa proteina come biomarcatore del vigore del seme in questa specie, confermandone l'accumulo dopo *priming* parallelamente al mantenimento di elevati livelli di una proteina termostabile (membro putativo della classe 3 della LEA). Anche in *Brassica oleracea* un gruppo distinto di geni coinvolti nella maturazione del seme (Em6 e RAB18, appartenenti rispettivamente al gruppo 1 e 2 delle LEA) sono stati correlati alla tolleranza allo stress a seguito di *osmopriming* (Soeda et al., 2005). Meno definito risulta invece il ruolo nell'acquisizione della tolleranza agli stress dopo *priming* delle deidrine (DHN), altre LEA del gruppo 2 il cui ruolo nella protezione dagli stress abiotici è stato ampiamente dimostrato (Close, 1996; Rorat et al., 2006). In barbabietola e pisello, ad esempio, si osserva una degradazione delle DHN durante l'*osmopriming* (Capron et al., 2000; Baker et al., 1995), mentre in semi di spinacio si osserva una iniziale attivazione dell'espressione di CAP85 (una proteina associata alla tolleranza al disseccamento) e di altre proteine *dehidrin like* durante il trattamento, che gli autori interpretano come una risposta protettiva allo stress osmotico (Chen et al., 2012).

In relazione all'*osmopriming*, in letteratura sono riportati anche cambiamenti nei sistemi antiossidanti. Incrementi dell'attività di enzimi del ciclo ascorbato-glutatione (ascorbato perossidasi) e accumulo di glutazione ridotto (GSH) sono stati recentemente rilevati in semi di spinacio (Chen e

Arora, 2011). Queste molecole tuttavia sembrano implicate nella germinazione più che nella tolleranza al deterioramento (De Tullio e Arrigoni, 2003; Bailly et al., 2001; Garnczarska e Wojtyla, 2008). Al contrario l'attività di enzimi coinvolti nel mantenimento della longevità durante la conservazione, quali catalasi e superossido dismutasi, decresce durante il *priming* suggerendo che la preparazione alla germinazione posta in essere da questo trattamento attivi i sistemi protettivi tipici delle prime fasi della germinazione, inibendo invece quelli relativi alla longevità (Chen e Arora, 2011).

In *Brassica napus* i geni di due diverse acquaporine, sovra-espressi in semi sottoposti a *priming* rispetto al controllo, sono stati messi relazione al trasporto di molecole d'acqua necessarie al metabolismo delle proteine di riserva o alla crescita cellulare che porta alla protusione della radichetta (Gao et al., et al., 1999). In *Arabidopsis* Gallardo et al. (2001) hanno rilevato l'accumulo di tubulina, cruciferina e proteine *heat shock* in risposta a trattamenti di *priming* .

Per identificare possibili marcatori del vigore in relazione al *priming*, un altro approccio promettente sembra quello di valutare i cambiamenti indotti da questo trattamento nel trascrittoma e nel proteoma di semi deteriorati artificialmente. Bailly et al. (1998) hanno dimostrato come questo trattamento in girasole possa mitigare gli effetti del deterioramento riattivando i sistemi antiossidanti che tengono sotto controllo la produzione di ROS nella cellula. Anche durante l'*osmopriming* di semi di girasole invecchiati artificialmente viene promossa la sintesi di una specifica isoforma della catalasi. Gli autori attribuiscono a questo enzima un ruolo

chiave nel miglioramento della qualità fisiologica durante il *priming* dato che, provocando l'inibizione della catalase tramite l'aggiunta di aminotriazolo al PEG, si annullano gli effetti benefici del *priming* sulla germinazione (Kibinza et al., 2011).

In semi di barbabietola, sottoposti prima a deterioramento controllato e poi a *priming*, infine, si è rilevato l'accumulo di proteine tra cui enzimi coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi solforati, nella mobilizzazione di amido e lipidi, nella sintesi proteica e nel ciclo del metile (Catusse et al., 2011).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo generale di questo lavoro è quello di contribuire a comprendere i meccanismi alla base del vigore del seme. In particolare qui si è voluto considerare il coinvolgimento della L-isoaspartil O-metiltransferasi (PIMT) nella tolleranza al deterioramento in girasole. Il ruolo di riparazione proteica di questo enzima, la cui presenza in forma attiva è stata rilevata nei semi di molte specie, è stato recentemente messo in relazione al vigore del seme. *Helianthus annuus* è specie di notevole rilevanza economica e modello per studi di genetica, genomica e trascrittomica nelle Compositae, famiglia che annovera molte colture di interesse economico. Inoltre, il seme di girasole, essendo particolarmente suscettibile ai processi deteriorativi durante la conservazione, costituisce un buon modello per studi di tipo fisiologico.

La ricerca, condotta su 16 linee già oggetto precedenti studi genetici e fisiologici, si è articolato nei seguenti obiettivi:

- Isolare il gene *PIMT* in girasole e caratterizzarne la variabilità a livello nucleotidico e aminoacidico
- Caratterizzare i materiali in termini vigore ed espressione genica *PIMT* in risposta all'invecchiamento accelerato e al *priming*
- Correlare il dato fisiologico con l'espressione genica al fine di valutare il ruolo potenziale del meccanismo di riparazione cellulare di PIMT nel vigore del seme di girasole

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE E PRODUZIONE DEL SEME

Lo studio è stato condotto su 16 linee inbred di girasole, comprendenti genotipi mantenitori della maschio-sterilità e ristoratori della maschio-fertilità, rappresentative della diversità del germoplasma coltivato (Tabella 1). Tali materiali erano stati precedentemente scelti per variabilità in termini di germinabilità in risposta a condizioni sub-ottimali di temperatura e a seguito di invecchiamento accelerato (Battistini, 2011). Le accessioni fanno parte della collezione di germoplasma presente al LaRAS, composta da 126 genotipi provenienti da differenti istituti di ricerca.

Tutte le linee sono state riprodotte per autofecondazione nell'estate 2010 presso l'azienda sperimentale dell'Università di Bologna situata a Cadriano, al fine di mantenere la collezione ed ottenere una quantità sufficiente di seme per i test di laboratorio. Prima della semina gli acheni sono stati trattati con Apron® XL (340 g/l metalaxil-M) in ragione di $3 \mu\text{l g}^{-1}$, come protezione contro *Plasmopara helianthi*, l'agente causale della peronospora del girasole. Per il trattamento, i semi sono stati posti in un tubo di polipropilene da 50 ml con la soluzione fungicida, agitati dolcemente per distribuire uniformemente il prodotto e posti ad asciugare per due giorni a temperatura ambiente nel flusso d'aria di una cappa chimica.

Le accessioni sono state allevate in campo, in parcelle non replicate costituite da file singole lunghe 3 m distanziate tra loro 0,8 m. Venti semi per accessione sono stati seminati manualmente alla profondità di 5 cm. Al fine di proteggere i semi da insetti terricoli, nel solco è stato distribuito un trattamento geodisinfestante microgranulare (FORCE 12Kg ha⁻¹),

immediatamente ricoperto di terra. Per proteggere i semi dagli uccelli, dopo la semina le parcelle sono state coperte con un telo di tessuto non tessuto, rimosso una volta avvenuta l'emergenza. Fino allo sviluppo delle prime 3-4 foglie, le plantule sono state protette mediante una rete di nylon sostenuta da archetti ad un'altezza di 0,60 m. Successivamente si è proceduto al diradamento delle piante fino ad ottenere 8-10 piante per accessione. Durante la fase di crescita vegetativa sono stati eseguiti due trattamenti di Iprovalicarb (Melody, 4 Kg/ha, 4 g/L) al fine di prevenire attacchi di peronospora.

Le piante sono state autofecondate mediante isolamento delle calatidi entro sacchetti di tessuto non tessuto (55 g m^{-2}). Tale operazione è stata effettuata alcuni giorni prima della deiscenza delle antere, quando la colorazione gialla dei fiori del raggio coprenti la parte periferica del disco risultava visibile tra le brattee semidischiuse. La raccolta è avvenuta scalarmente secondo i diversi tempi di maturazione delle linee. Le calatidi, recise dallo stelo quando il ricettacolo era completamente ingiallito e le brattee apparivano marroni, sono state sgranate manualmente, per evitare danni meccanici; gli acheni sono stati raccolti in sacchetti di rete di plastica e posti ad asciugare a 35°C in ambiente ventilato per 3 giorni. Le impurità e i semi vuoti sono poi stati rimossi mediante setacciatura e ventilazione. Il seme pulito è stato conservato in sacchetti di carta a 15°C , 50% UR, al buio.

3.2 ISOLAMENTO DEL GENE *PIMT* IN *HELIANTHUS ANNUUS*

3.2.1 ISOLAMENTO DELLA SEQUENZA GENOMICA PARZIALE

L'isolamento della sequenza genomica di *PIMT* di girasole ha preso l'avvio da ricerche in banche dati di sequenze espresse (EST) di questa specie che avessero elevata omologia con quella di *PIMT* di *Arabidopsis thaliana* (*AtPIMT1*). L'indagine bioinformatica è stata condotta avvalendosi degli strumenti disponibili nella banca dati TIGR Gene Indices (Quackenbush et al., 2000; Quackenbush et al., 2001) che, assemblando sequenze espresse, permette di ottenere sequenze consenso putative (TCs = Tentative Consensus sequences) utilizzabili nella ricerca di geni ortologhi. Al momento dell'utilizzo, il sistema poteva accedere ad un elevato numero di EST di girasole (HAGI: Helianthus annuus Gene Index, <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=sunflower>).

Attraverso una ricerca per parola chiave, è stata così identificata una TC di girasole (TC57615) derivante da tre EST (accessioni GenBank: BQ972860, BQ916423, BQ974796), caratterizzata da una elevata similarità (74%) con la proteina L-isoaspartil O-metiltrasferasi di *Arabidopsis*.

L'allineamento tra la sequenza TC e quella di *AtPIMT1* ha permesso di determinare la posizione relativa degli EST di girasole, di identificare le giunzioni putative tra esoni ed introni e di progettare primer per l'amplificazione del gene (Figura 1).

Per le successive analisi genetiche il DNA è stato estratto da un bulk di 5 foglie liofilizzate per ciascuna accessione utilizzando il metodo descritto da

Saghai Maroof et al. (1984) con alcune modifiche (Battistini, 2011), quantificato e diluito a una concentrazione di 20 ng/ μ l. Per il sequenziamento si è considerata la linea HA89 che rappresenta un genotipo di riferimento nel miglioramento genetico e negli studi di biologia molecolare di questa specie.

Un primo tentativo, mirato ad ottenere gran parte della sequenza in un'unica reazione, è stato compiuto utilizzando primer (Fw1, Rw1) molto simili a quelli costruiti da Ogè et al. (2008) per amplificare l'ortologo in *Arabidopsis*, con solo lievi modifiche sulla base della sequenza putativa di girasole. Dei due primer utilizzati per la reazione, solamente quello *forward* ha prodotto un amplicone (493 pb) per il quale si è confermata l'omologia con il secondo esone di *AtPIMT1*.

Per estendere la sequenza genomica di *Helianthus* si è fatto ricorso al sequenziamento successivo di ampliconi relativi a segmenti diversi e parzialmente sovrapposti, ottenuti a partire da primer progettati per l'appaiamento su esoni (Figura 1b). I primer, costruiti con il programma "PRIMER3" (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), sono stati utilizzati per eseguire amplificazioni nidificate (nested-PCR) ove il prodotto della prima reazione, diluito 1:100, veniva utilizzato come stampo per quella successiva. Nella Tabella 2 sono elencate le sequenze dei primer impiegati, le relative temperature di *annealing* e le lunghezze dei prodotti di amplificazione.

Le amplificazioni, salvo specifiche indicazioni, sono state condotte con 90 ng di DNA genomico in un volume di reazione di 25 μ l contenente 1X tampone PCR, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM di ciascun dNTP, 0,5 mM di ogni primer e 1 U di

DNA polimerasi AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems). Il profilo termico PCR utilizzato comprendeva un ciclo iniziale per l'attivazione della *Taq* (95 °C per 15 min), seguito da 40 cicli costituiti da 30 s a 94 °C, 45 s a 56 °C e 1,3 min a 72 °C, con estensione finale a 72 °C per 10 min. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati in gel di agarosio 1,8% e visualizzati su transilluminatore UV 312 nm dopo colorazione in una soluzione di bromuro di etidio (10 µg/ml). Dato che l'analisi mostrava la presenza di una singola banda nel profilo, la miscela di reazione è stata purificata con il kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega Italia). Il prodotto di amplificazione è stato infine quantificato mediante spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf), diluito in acqua *nuclease-free* ad una concentrazione finale di 50 ng/µl e fatto sequenziare all'esterno (MWG Biotech AG, Milano).

3.2.2 COMPLETAMENTO DELLA SEQUENZA GENOMICA MEDIANTE *PCR-WALKING*

Le estremità 5' e 3' della sequenza codificante di *PIMT* di girasole sono state ottenute utilizzando un approccio *PCR-walking* come descritto da Cottage et al. (2001) con leggere modifiche (Figura 1c). Questa metodica consiste nell'amplificazione di frammenti di restrizione, contenenti la sequenza di interesse, mediante coppie di primer di cui uno ancorato nella regione nota, l'altro complementare alla sequenza di un adattatore legato alle estremità dei frammenti di restrizione (AP1 = *adapter primer 1*). Il prodotto di questa prima amplificazione viene poi utilizzato come stampo per una successiva

reazione nidificata, condotta usando una coppia di primer più interni, ma entrambi sempre ancorati ai rispettivi medesimi elementi (AP2).

Due μg e 500 ng di DNA genomico della linea HA89 sono stati digeriti separatamente per una notte con 80 U degli enzimi *SmaI*, *EcoRV*, *DraI* e *ScaI*, il primo con incubazione a 25°C, i rimanenti a 37°C. Per tali enzimi era già stata accertata l'assenza di siti di restrizione nella zona di appaiamento dei primer e nella regione adiacente in 3' sulla sequenza conosciuta. Al termine della digestione, i campioni sono stati incubati a 65°C per 10 min per inattivare gli enzimi e successivamente purificati mediante trattamento con cloroformio. Il DNA è stato precipitato con aggiunta di 1/10 del volume di NaOAc 3 M (pH 5.2) e di 2 volumi di etanolo 100%, raccolto mediante centrifugazione a 14,000 g per 10 min, essiccato ed infine risospeso in 20 μl di acqua sterile. I frammenti di restrizione, ad estremità piatte, sono stati ligati con l'adattatore oligonucleotidico a doppio filamento (Tabella 3), incubando per una notte a 16°C 10 μl della miscela di digestione e 50 pmol di adattatore con 10 U di DNA ligasi T4 e 2 μl del suo buffer in un volume finale di 20 μl . La reazione è stata bloccata con incubazione a 65°C per 10 min e ciascuna libreria di frammenti di restrizione con adattatori è stata diluita 1:10 in TE (pH 8).

Le reazioni di amplificazione per la *PCR-walking* alle estremità 5' e 3' sono state effettuate in un volume di reazione di 25 μl contenente 1X tampone PCR, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM per ciascun dNTP, 0,8 mM di ogni primer, 1 U AmpliTaq Gold® DNA polymerase (Applied Biosystems) utilizzando, come stampo, 3 μl di ciascuna libreria. Il profilo termico utilizzato comprendeva un ciclo iniziale per l'attivazione della polimerasi (95 °C per 15 min), seguito

poi da 35 cicli rappresentati da 30 s a 94 °C, 1 min a 60°C, 30 s a 72 °C, con estensione finale a 72 °C per 10 min. Il prodotto PCR così ottenuto è stato diluito 1:100 e successivamente usato come stampo per una PCR nidificata, condotta nelle medesime condizioni di amplificazione, utilizzando i primer interni. Le miscele di amplificazione che, in gel di agarosio, mostravano la presenza di un singolo prodotto sono state purificate e sequenziate come descritto sopra.

La Tabella 3 riporta le sequenze degli oligonucleotidi impiegati. Le sequenze degli adattatori (ADAPL e ADSPS) e dei primer disegnati su di essi (AP1 e AP2) sono state lievemente modificate rispetto a Cottage et al. (2001). Al fine di dirigere la reazione "a valle" del quarto e ultimo esone e "a monte" del secondo esone, sono stati disegnati primer sulla sequenza conosciuta di *PIMT* in HA89, rispettivamente in prossimità di 5' (primer 5' *PCR-walking*) o di 3' (primer 3' *PCR-walking*).

Per il primo obiettivo è stata eseguita una prima amplificazione con AP1 come primer *reverse* e Fw1118 come primer *forward* ancorato e, successivamente, con AP2 (*reverse*) e FW1161 (*forward*). Per il secondo, le amplificazioni hanno previsto l'uso di due PCR nidificate, la prima con le coppie AP1 (*forward*) / Rw537 e AP2 / Rw217, la seconda con le coppie AP1 / Rw217 e AP2 / Rw271.

3.2.3 ISOLAMENTO DELLA SEQUENZA CODIFICANTE PARZIALE

Le sequenze nelle regioni di giunzione tra esoni e introni, dedotte inizialmente dall'allineamento tra la sequenza TC di girasole e *AtPIMT1* utilizzando il programma MEGA ver. 5.3 (Tamura et al., 2011), sono state

confermate dal sequenziamento di parte del cDNA della linea HA89, ottenuto per l'analisi di espressione (vedi paragrafi successivi). L'amplificazione è stata condotta utilizzando 100 ng di cDNA retrotrascritto in un volume finale di 30 µl contenente 1X di tampone PCR, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM per ciascun dNTP, 0,5 mM di ogni *primer*, 1 U di EX Taq™ DNA polymerase (Takara Bio Europe). I primer di innesco utilizzati sono stati Fw115 (Tabella 4) Rw503 (Tabella 2). Il profilo termico comprendeva una fase iniziale di 3 min a 95 °C per l'attivazione della polimerasi, seguito da 40 cicli rappresentati da 30 s a 94 °C, 45 s a 60 °C, 1 min 72 °C, ed una estensione finale a 72 °C per 7 min. L'amplificato è stato analizzato in gel di agarosio, purificato, diluito in acqua *nuclease free* ad una concentrazione finale di 50 ng/µl ed inviato a MacroGen Europe (Amsterdam, Netherland) per il sequenziamento.

Le relazioni della proteina PIMT di girasole, dedotta dalla sequenza codificante, rispetto a quelle di *Arabidopsis*, cece e frumento, sono state analizzate mediante allineamento multiplo con il programma MAFFT (v6.864b) (Figura 3).

3.3 CARATTERIZZAZIONE DEL GENE *PIMT* NELLE 16 LINEE

3.3.1 SEQUENZIAMENTO

Per determinare la variabilità di *PIMT*, è stata ottenuta la sequenza genomica di una regione di 1440 basi, comprendente gli esoni 2, 3 e 4, in ciascuna delle 16 accessioni mediante sequenziamento di amplificati relativi

a tre porzioni parzialmente sovrapposte prodotte con altrettante coppie di primer. La Tabella 4 riporta le sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione dei tre frammenti e la lunghezza di questi ultimi. Le amplificazioni sono state condotte utilizzando 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 30 μ l contenente 1X di tampone PCR, 2 mM $MgCl_2$, 0,25 mM per ciascun dNTP, 0,5 mM di ogni *primer*, 1 U di EX Taq™ DNA polimerasi (Takara Bio Europe). Il profilo termico comprendeva una fase iniziale di 3 min a 95 °C per l'attivazione dell'enzima, seguito da 40 cicli rappresentati da 30 s a 94 °C, 45 s a 60 °C, 1 min 72 °C, ed una estensione finale a 72 °C per 7 min. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati in gel di agarosio, purificati come sopra descritto ed inviati a Macrogen Europe (Amsterdam, Netherland) per il sequenziamento.

3.3.2 ANALISI BIOINFORMATICA

I dati di sequenza sono stati ricevuti come cromatogramma, visualizzati mediante il programma CHROMAS LITE ver. 2.01 (Technelysium Pty Ltd) e controllati manualmente. I tre frammenti sono stati poi assemblati per ricostruire la sequenza genomica comprensiva dei tre principali esoni e dei due introni. Le sequenze sono state allineate usando CLUSTALW2 e MULTALIN versione 5.4.1 (Corpet, 1988).

I polimorfismi di sequenza sono stati analizzati usando il programma DNASP ver. 5 (Librado e Rozas, 2009) calcolando la diversità aplo-tipica (H_d), il numero medio di differenze nucleotidiche (k), la diversità nucleotidica (π) che indica il numero medio di differenze di nucleotidi per sito tra sequenze; (Nei, 1987), e il numero di siti segreganti (θ ; Watterson, 1975). I valori di π

e θ sono poi stati valutati mediante test di D di Tajima (Tajima, 1989) per saggiare la neutralità dei polimorfismi.

Semplici caratteri biochimici delle proteine dedotte, quali il punto isoelettrico (Ip) e il peso molecolare (Mw), sono stati calcolati utilizzando la risorsa COMPUTE PI/MW del server di proteomica EXPASY (Gasteiger et al, 2003; 2005). La struttura secondaria delle proteine è stata inferita mediante il programma HNN (Combet et al., 2000); tale software attribuisce ad ogni residuo aminoacidico nella proteina un punteggio che rappresenta la probabilità di esistere in uno dei tre differenti stati (alfa elica, *extended strand*, o *random-coil*) e permette di predire l'incidenza percentuale di questi ultimi nella sequenza proteica.

3.4 SVILUPPO DI UN SAGGIO PER L'ESPRESSIONE DEL GENE *PIMT*

3.4.1 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata da campioni di semi privati del pericarpo, congelati in azoto liquido, conservati a -80°C , e finemente macinati in mortaio in presenza di azoto liquido; una punta di spatola (circa 80 mg) di materiale polverizzato è stata sottoposta ad estrazione con il kit Nucleospin® RNA/Protein (Macherey-Nagel). L'RNA ottenuto è stato risospeso in 60 μl di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) e, dopo averne verificata l'integrità mediante elettroforesi in agarosio 1,5%, è stato conservato a -80°C .

3.4.2 TRATTAMENTO CON DNASI E SINTESI DEL PRIMO FILAMENTO DI cDNA

Al fine di eliminare eventuali molecole di DNA genomico contaminanti, per ciascun campione circa 1 µg di RNA totale è stato trattato con DNAsi. La miscela di reazione conteneva 6 µl di RNA estratto, 1 µl di tampone di reazione 10X, 1 µl di acqua DEPC, 2 U di RQ1 (RNase Free DNase, Promega). La reazione è stata incubata a 37 °C per 1 h, dopo di che l'enzima è stato disattivato con l'aggiunta di 1 µl di RQ1 Stop Solution ed incubazione a 65°C per 10 min.

Per escludere la presenza di DNA residuo nei campioni di RNA così ottenuti, che potrebbe interferire nella successiva quantificazione, una piccola aliquota di questi (1 µl) è stata utilizzata come stampo in una reazione di amplificazione con primer Fw102 e Rw655 (Tabella 4) posizionati sul primo e secondo introne. L'assenza del relativo amplificato è stata accertata mediante elettroforesi in agarosio e solamente i campioni privi di contaminazione di DNA sono stati sottoposti a retrotrascrizione.

Per la sintesi del primo filamento di cDNA si è utilizzato il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). La reazione è stata condotta in una soluzione di 20 µl contenenti 8 µl di RNA, tampone di retrotrascrizione 1X, RT Random Primers 1X, dNTP Mix 1X, 1 µl di inibitore dell'RNAsi, 1 µl di MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 5,2 µl di acqua trattata con DEPC. La miscela è stata incubata in un termociclatore secondo il seguente profilo termico: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C e 5 min a 85 °C.

Per ottenere una stima approssimativa delle rese in cDNA ottenute dai diversi campioni, una piccola aliquota di essi è stata impiegata come stampo in una reazione di PCR condotta utilizzando primer posizionati sulla regione codificante del gene di interesse (PIMTFw; PIMTRw Tabella 5); i prodotti di amplificazione sono stati quindi analizzati in gel di agarosio. Al fine di rendere la concentrazione quanto più possibile uniforme, i campioni di cDNA sono stati diluiti sulla base dell'intensità di fluorescenza dei relativi amplificati.

3.4.3 SVILUPPO DI UN SAGGIO *REAL TIME*

Il livello di espressione di *PIMT* è stato stimato mediante PCR *real time*. Per ciascun campione, la determinazione è avvenuta con riferimento ad un calibratore rappresentato dal cDNA ottenuto da una tesi non trattata (noAA noPr) della linea HA89.

Inoltre, per ovviare a differenze nella quantità iniziale di cDNA impiegata per ciascuna reazione, tutte le quantificazioni sono state normalizzate rispetto al livello di espressione di controlli interni, cioè di geni di riferimento (*reference genes*). Tuttavia, essendo noto (Czechowski et al., 2005) che anche l'espressione di alcuni dei geni comunemente usati a questo scopo (*housekeeping*) può essere variamente modulata in risposta a diversi trattamenti, si è condotta una valutazione preliminare di alcuni di essi al fine di selezionare quelli più adatti alla normalizzazione in quanto meno influenzati dalle condizioni sperimentali adottate in questo esperimento.

Tra i geni *reference* potenzialmente utilizzabili, sono stati presi in considerazione l'*actina-1* l'*elongation factor-1* e l'*S19* (codificante per una

subunità ribosomiale); i primi due sono tra quelli più frequentemente utilizzati in girasole (Fernandez et al., 2010), il terzo è stato specificatamente impiegato per la quantificazione relativa nel seme (Bailly, comunicazione personale).

3.4.4 PROGETTAZIONE DEGLI OLIGONUCLEOTIDI

La messa a punto di un protocollo di quantificazione dell'espressione genica ha comportato lo sviluppo dei saggi PCR *real time*, con rilevamento mediante SYBR®Green, relativi ai geni *reference* e al gene di interesse *PIMT*. Al fine di aumentare la specificità del saggio per il cDNA e ridurre i rischi di rilevare gli amplificati generati da sequenze genomiche, per tutti i saggi uno dei due primer è stato posizionato su una giunzione introne/esone.

Le sequenze sono state ottenute mediante ricerche nelle banche dati HAGI (*Helianthus annuus* Gene Index, <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=sunflower> parte del The Gene Index Project;) e GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Per quanto riguarda l'actina, il punto di partenza per identificare la posizione delle giunzioni introne/esone è stato l'allineamento del cDNA dell'*actina-1* di girasole (accessione GenBank FJ487620) con la sequenza genomica di *actina-7* di *Arabidopsis* (accessione GenBank NC003076, 3052097-3054614 pb), nella quale erano già indicate le posizioni degli introni. Quindi è stata costruita una coppia di primer costituita dal *forward* nella giunzione tra il I e il II esone il *reverse* sul II esone). Per l'*elongation factor-1 (EF1)* è stata utilizzata la sequenza putativa consenso di una EST (TC 39882) ottenuta

mediante ricerca per parola chiave nella banca dati HAGI. Al fine di determinare le posizioni di giunzione esone/introne, non essendo disponibile la corrispondente sequenza genomica, sono state utilizzate le informazioni disponibili per *EF1* di *Lycopersicon esculentum* (accessione GenBank X53043.1). Le varie sequenze espresse parziali che compongono la sequenza putativa TC 39882, nella regione d'interesse per il disegno dei primer, sono state riallineate manualmente usando CLUSTALW2 al fine di correggere eventuali errori di sequenziamento. Infine è stata costruita una coppia di primer costituita dal *forward* nella giunzione tra il I e il II esone il *reverse* sul II esone). Anche per *S19* la sequenza putativa consenso della EST di girasole TC 43824 è stata trovata mediante ricerca per parole chiave nella banca dati HAGI. Le sequenze dei DNA genomici di girasole EF461425, EF461428, EF461421, EF461424, EF461426 di GenBank sono state utilizzate sia per identificare le giunzioni esone/introne, insieme alla sequenza dell'S19 in *Arabidopsis* CP002688 (24611158- 24612202 pb), sia per ricavare una sequenza consenso utile per disegnare i primer. è stata costruita quindi una coppia di primer con il *forward* sul II esone e il *reverse* nella giunzione tra il II e il III esone. Infine, per il gene *PIMT* si è fatto riferimento alla sequenza precedentemente isolata, avendo cura di evitare, per la progettazione degli oligonucleotidi, le poche regioni polimorfiche riscontrate.

Per progettare tutti gli oligonucleotidi ci si è avvalsi del programma PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Per i primer sono stati posti come requisiti una temperatura di *melting* di circa 60

°C, un contenuto in GC compreso tra 40 e 60%, una lunghezza di 18-22 basi e una lunghezza ottimale dell'amplicone di 100-150 pb.

Le sequenze dei primer e la lunghezza dei relativi amplificati per i tre geni di riferimento e per *PIMT* sono riportate nella Tabella 5.

3.4.5 AMPLIFICAZIONE REAL-TIME

Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl contenenti 2 µl di soluzione cDNA stampo, 1X di SYBR®Green I Master (Roche, Basel, Switzerland), 0,5 mM di ogni primer e 6 µl di acqua sterile. Ogni reazione di PCR è stata realizzata in triplicato.

L'amplificazione è stata eseguita con un apparecchio LightCycler® 480 (Roche, Basel, Switzerland) utilizzando il seguente profilo termico: attivazione iniziale della polimerasi (10 min a 95 °C), 45 cicli di amplificazione rappresentati da denaturazione per 10 s a 95°C e appaiamento/estensione per 1 min a 62°C. Per ogni campione il *crossing point* (Cp) è stato determinato mediante il "metodo della massima derivata seconda" utilizzando il software LightCycler 3.5 (Roche Molecular Biochemicals).

Per monitorare la presenza di "falsi positivi", dati da possibili contaminazioni dei reagenti con acidi nucleici, in ogni reazione è sempre stato incluso un "bianco", ove il cDNA stampo era sostituito da acqua sterile. Qualora fossero rilevati segnali con valori di Cp >40 il livello di contaminazione era considerato trascurabile. Per confermare l'identità e la specificità degli ampliconi, al termine della reazione è stata condotta l'analisi di *melting* rilevando in maniera continua l'emissione della fluorescenza in seguito alla

dissociazione del prodotto PCR con l'incremento progressivo della temperatura fino a 95 °C. Le curve di *melting* sono state trasformate in picchi riportando in ascissa la temperatura e in ordinata la derivata seconda della fluorescenza sulla temperatura ($-\Delta I/\Delta T^2$).

3.4.6 VALIDAZIONE DEI GENI DI RIFERIMENTO CANDIDATI

Al fine di individuare i geni *reference* da utilizzare nei successivi esperimenti, *Actina-1*, *Elongation Factor-1* ed *S19* sono stati posti a confronto utilizzando il foglio Excel modificato BESTKEEPER (Plaffl et al., 2004). Il software analizza la variabilità nell'espressione dei geni *reference* ed effettua un'analisi comparativa tra essi sulla base delle correlazioni a coppia tra i rispettivi valori di Cp. Il principio alla base della scelta è che dei buoni geni di riferimento dovrebbero avere *pattern* di espressione simili, e i loro livelli di espressione dovrebbero risultare altamente correlati. Una volta identificati i geni a presunta stabile espressione, i relativi dati sono riuniti in un indice denominato *BestKeeper index*. L'affidabilità del gene candidato viene espressa come correlazione (r e valore di probabilità associato) tra ciascun gene candidato e l'indice.

L'efficienza di reazione per ciascun *reference* e per il bersaglio *PIMT*, è stata determinata mediante la costruzione di rette di calibrazione basate su diluizioni seriali di cDNA. Per i due geni *reference* selezionati si è utilizzata la diluizione seriale 1:10, mentre per *PIMT*, meno espresso, una diluizione seriale 1:2. L'efficienza di reazione è data da

$$E = 10^{-1/\text{pendenza}}$$

dove la pendenza è quella della retta di regressione dei valori di C_p osservati sul logaritmo della concentrazione del cDNA stampo (Rasmussen, 2000). La massima efficienza teorica è pari a 2, corrispondente ad un raddoppiamento della quantità di amplificato per ogni ciclo di amplificazione.

3.5 PREPARAZIONE DEL SEME PER I TEST FISIOLGICI E DI ESPRESSIONE GENICA

La risposta a condizioni di deterioramento o di stimolazione del seme, in termini di germinazione e di espressione di *PIMT*, delle linee oggetto di studio, è stata valutata sottoponendo i semi, rispettivamente, a trattamenti di invecchiamento accelerato (*aging*, AA), di *priming* (Pr) e alla loro combinazione (*aging* seguito da *priming*, AA Pr), e mediante confronto con un controllo non trattato (noAA noPr). Per ciascun genotipo 600 semi sono stati sterilizzati per immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio 1% per 15 min con leggera agitazione, risciacquati in acqua corrente e poi in acqua deionizzata, asciugati con carta bibula ed infine posti ad essiccare in flusso d'aria per una notte. Una aliquota di 140 semi è stata sottoposta a ciascuno dei trattamenti sopra descritti.

3.5.1 TRATTAMENTO DI AGING

Il trattamento di invecchiamento accelerato è stato condotto in apposite scatole in polistirene (11.0 × 11.0 × 3.5 cm) con coperchio a tenuta, dotate di un vassoio interno costituito da piedini supportanti un telaio in rete metallica (mesh 14 × 18) (Hoffman Manufacturing Inc., OR, USA). I semi sono stati disposti sui telai, inseriti nelle scatole contenenti sul fondo 40 ml

di acqua deionizzata ed incubati a 40°C per 72 h. All'interno delle scatole l'umidità, misurata con un termoigrografo (Oregon Scientific EMR812HGN), era costantemente prossima al 95% e le temperature, monitorate in continuo mediante sonde Pt100, si mantenevano entro $\pm 0,3$ °C rispetto alla temperatura impostata. Tali condizioni sperimentali erano state precedentemente individuate come idonee ad evidenziare differenze di vigore in termini di velocità di germinazione, senza peraltro incidere apprezzabilmente sulla vitalità del seme (Battistini, comunicazione personale).

3.5.2 TRATTAMENTO DI OSMOPRIMING

Il trattamento di *osmopriming* è stato condotto incubando i semi a 15 °C per 7 d in una soluzione PEG 8000 (glicole polietilenico ad alto peso molecolare; Sigma Aldrich) alla concentrazione di 336 g L⁻¹, determinante un potenziale osmotico di -1,5 MPa (Michel, 1983). Tale livello di potenziale era quello che, in prove preliminari condotte utilizzando semi non invecchiati ed invecchiati di due genotipi, era risultato più efficace nel migliorare la performance accelerando l'andamento della germinazione. Durante il trattamento i semi erano in buone condizioni di aerazione in quanto non completamente sommersi dalla soluzione, ma semplicemente depositi su un sottile strato di cotone idrofilo imbevuto di essa.

3.5.3 DETERMINAZIONE DELLA GERMINABILITA'

Il test di germinazione è stato condotto in scatole di plastica (18,5 × 12,5 × 5,5 cm; Loire Plastic, France) contenenti sul fondo un foglio di carta bibula

liscia su cui era disposto un foglio di carta pieghettata (120 g/m²; Sartorius, Germania), ponendo un seme in ciascuna delle 50 pieghe. Dopo la semina, il substrato è stato imbibito con 35 ml di acqua deionizzata e le scatole sono state incubate a 15°C al buio per tutta la durata della prova (15 d). Per ciascuna accessione sono state analizzate due repliche di 50 semi.

Ogni 24 ore i semi germinati venivano conteggiati e rimossi dalle scatole. Un seme era considerato germinato quando la radichetta protrudeva di almeno 1 mm dal pericarpo (germinazione fisiologica). Per tutti i campioni sono stati rilevati la germinabilità finale, il tempo per raggiungere il 50% della percentuale massima di germinazione (T_{50} , determinato graficamente) e il tempo medio di germinazione secondo la formula $TMG = \Sigma(ni \times di) / \Sigma ni$, dove ni è il numero di semi germinati nel giorno i e di il numero di giorni dalla semina al giorno i .

3.5.4 DETERMINAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI *PIMT*

La valutazione dell'espressione del gene *PIMT* nelle 64 tesi, derivanti dalla combinazione dei tre fattori sperimentali (genotipo, *aging* e *priming*), è stata condotta con il saggio *real time* sopra descritto. Per l'estrazione dell'RNA per ogni tesi sono state considerate due repliche di 20 semi ciascuna. I semi sono stati privati del pericarpo, sezionati longitudinalmente per costituire una aliquota di scorta, congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C. L'estrazione dell'RNA, dalle due repliche costituite da 20 mezzi-semi, e la retrotrascrizione a cDNA sono state effettuate secondo i protocolli sopra indicati.

Per ciascun gene, ogni campione di cDNA è stato analizzato mediante PCR *real time* con tre repliche tecniche, per un totale di 384 determinazioni. Le determinazioni per *PIMT* e i due *reference* relative a ciascun campione sono state effettuate nel medesimo esperimento di amplificazione. Le 1152 determinazioni complessive sono state effettuate in 16 diverse amplificazioni, analizzando dapprima tutte le prime e a seguire tutte le seconde repliche. Per ciascuna replica, i campioni relativi ad ogni combinazione di trattamenti sono stati analizzati in due amplificazioni successive; la distribuzione dei singoli genotipi tra le diverse amplificazioni è stata realizzata in modo da equilibrare quanto più possibile il numero di occorrenze di ciascuna combinazione a coppia tra genotipi. In ogni esperimento di amplificazione è stata analizzata una aliquota dello stesso campione di cDNA del calibratore (HA89, noAA noPr).

La quantificazione relativa dell'espressione del gene *PIMT*, infine, è avvenuta utilizzando il software GENORM, il quale calcola per ciascun campione un fattore di normalizzazione (NF) basato sulla media geometrica dell'espressione dei due geni *reference*, e tiene conto dell'efficienza di ciascuna reazione (Vandesompele et al., 2002).

3.5.5 ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali di germinabilità, TMG e T_{50} , e i dati di espressione genica, sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) secondo un disegno fattoriale. I dati di germinabilità, espressi in percentuale, sono stati analizzati previa trasformazione angolare ($\arcseno \sqrt{P}$, ove P = percentuale espressa in termini frazionari). La variabilità dovuta alle

differenze tra le 64 tesi, derivanti dalla combinazione di 16 linee, due livelli di *aging* (AA) e due livelli di *priming* (Pr), è stata suddivisa secondo gli effetti principali e le interazioni di primo (Linee x AA, Linee x Pr, AA x Pr) e secondo ordine (Linee x AA x Pr).

I test F sono stati calcolati assumendo un modello fisso. Il confronto tra valori medi delle linee è stato effettuato con la procedura Tukey (Steel e Torrie, 1980) calcolando il valore critico di significatività (w) come: $q_{\alpha}(p, f_e) * S_{\bar{y}}$, ove q_{α} è un valore tabulare identificato in corrispondenza del numero di medie a confronto (p) e dei gradi di libertà dell'errore sperimentale (f_e) e $S_{\bar{y}}$ è l'errore della media. Il medesimo test è stato utilizzato anche per il confronto tra effetti dei trattamenti di invecchiamento accelerato e di *priming* delle singole linee, misurati come differenze tra il valore delle tesi trattate ed il controllo, sostituendo all'errore della media, l'errore della differenza ($S_D = S_{\bar{y}} * \sqrt{2}$).

I test di confronto tra linee per quanto riguarda la germinabilità sono stati effettuati sui valori trasformati e quindi riportati in tabella in corrispondenza dei valori originari.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 ISOLAMENTO DEL GENE *PIMT* IN *HELIANTHUS ANNUUS*

4.1.1 ISOLAMENTO DELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA

In questo lavoro è stata isolata per la prima volta la sequenza del gene per la protein-isoaspartil metiltransferasi (*PIMT*) in girasole. Questo risultato, oltre a permettere l'analisi della variabilità genetica a questo *locus* in *Helianthus annuus*, apre la strada alla caratterizzazione di geni ortologhi in altre *Compositae*. Questo gene era stato caratterizzato finora solamente in tre specie vegetali, cioè *Arabidopsis* (Mudgett e Clarke, 1996; Xu et al., 2004), *Triticum aestivum* (Mudgett e Clarke, 1993) e *Cicer arietinum* (Verma et al., 2010). *Arabidopsis* è l'unico eucariota nel quale, ad oggi, siano state rilevate due copie del gene; per quanto concerne il frumento, finora è stata pubblicata solamente la sequenza codificante (*coding sequence*, CDS).

Lo scopo è stato raggiunto grazie alle informazioni relative al gene ortologo di *Arabidopsis* (*AtPIMT1*) e avvalendosi del supporto bioinformatico del database HAGI (*Helianthus annuus* Gene Index) che, attraverso l'assemblaggio di tre EST anonime di girasole, ha permesso di desumere una sequenza putativa consenso (TC57615) che ha rappresentato il punto di partenza del sequenziamento.

Le amplificazioni con primer modificati da quelli descritti da Ogè et al. (2008) per *Arabidopsis* e nuovi primer progettati su porzioni espresse del gene dalla sequenza consenso di *Helianthus annuus*, hanno permesso di ottenere una sequenza parziale di circa 1300 pb comprendente quasi

completamente la regione tra il secondo ed il quarto esone. Successivamente tale regione è stata considerevolmente estesa mediante *PCR-walking* sia in direzione 5' che 3'. Nel primo caso, mediante la libreria genomica generata dalla restrizione con l'enzima *EcoRV*, è stata ricavata la sequenza di giunzione tra il secondo esone ed il primo introne, con 124 pb di quest'ultimo. Una ulteriore estensione in questa direzione si è ottenuta dalla *PCR-walking* della libreria generata con *DraI*, che ha permesso di estendere la regione conosciuta a monte del secondo esone per complessivi 605 pb. All'estremità 3' è stata ottenuta, utilizzando sempre la libreria *DraI*, una sequenza di 445 pb comprendente la fine del quarto esone, fino a raggiungere il codone di stop e oltre, per un totale di 327 pb nella regione non codificante 3' UTR (*UnTranslated Region*). Le notevoli difficoltà incontrate nel raggiungimento di tale obiettivo, testimoniate dai numerosi passaggi di amplificazione ed analisi, sono attribuibili alla presenza in questa regione di molte sequenze ripetute, in particolare di tre tratti con almeno 12 ripetizioni mononucleotidiche sulle quali i tentativi di sequenziamento si arrestavano.

La sequenza genomica totale (2.230 pb) ottenuta per la linea HA89 è mostrata in Figura 2. La regione comprende una parte codificante (composta da tre esoni) ed una non codificante composta da due introni e parte della sequenza 3'-UTR. La porzione codificante consta di 687 pb suddivisi in tre esoni: l'esone II (272 pb), l'esone III (164 pb) e l'esone IV (251 pb). Tale organizzazione del gene è stata desunta inizialmente dall'allineamento con la sequenza espressa consenso di girasole e in seguito confermata dal sequenziamento di parte del cDNA della linea HA89 (vedi

seguito). Non è stato possibile, tuttavia, identificare con precisione il I° esone del gene *PIMT* nelle 605 pb, ottenute mediante *PCR - walking*, a monte del II° esone. Nelle altre specie vegetali ove l'informazione è disponibile, tale esone risulta costituito solamente da sei nucleotidi, in pratica il codone di inizio (ATG) ed un altro codone; in accordo con questo dato, anche nella sequenza espressa consenso di girasole (TC57615) esso ha la medesima lunghezza (ATGAAG, 5'-3'), ma nelle 605 pb ottenute in questo lavoro a monte del secondo esone, tale sequenza non è riscontrabile. Tuttavia tale sequenza putativa è stata confermata da una interrogazione dei database "Altri" (escludendo quello umano e del ratto), presenti in NCBI, effettuata con lo strumento blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizzando come *query* l'EST BQ916423. La ricerca così effettuata ha permesso di identificare ulteriori EST da *Helianthus* (accessioni GenBank: GE518109.1; EL431707.1; EL462092.1; EE640324.1), con omologia al secondo esone di *PIMT* da noi descritto, nelle quali anche la sequenza putativa primo esone (ATGAAG, 5'-3') era confermata. Per questo motivo, nelle successive valutazioni è stato assunto che la sequenza corrispondente al primo esone fosse: 5' - ATGAAG - 3'.

Sul DNA genomico la regione codificante il peptide è interrotta dall'introne II (525 pb), posizionato dopo il nucleotide +877, e l'introne III (86 pb) dopo il nucleotide +1566. Non è stato tuttavia possibile determinare con esattezza la lunghezza dei due introni, poiché entrambi contengono una ripetizione mononucleotidica (A/T) che favorisce lo "slittamento" della polimerasi in fase di sequenziamento e rende illeggibile l'elettroferogramma che segue la regione di poli (A/T). Il fenomeno di "slittamento" della polimerasi, che

durante la replicazione del DNA è la fonte maggiore di variazione nel numero di ripetizioni che compongono un microsatellite (Weber e Wong, 1993), può avvenire anche durante la reazione di PCR causando degli errori nel sequenziamento (Clarke et al., 2001). L'entità dello slittamento è proporzionale alla lunghezza della sequenza ripetuta (sia che si tratti di sequenze in tandem che di un singolo nucleotide); per questo motivo si ritiene che, nei mononucleotidi maggiori di 11 pb, l'attribuzione di un allele sia considerevolmente prona ad errore e non possa essere definita con certezza (Clarke et al., 2001).

4.1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA SEQUENZA AMINOACIDICA

Le 693 pb complessive (incluso l'esone I) che compongono la regione codificante di *PIMT* in girasole definiscono una proteina composta da 230 aminoacidi, analogamente a quanto si rileva in *Arabidopsis* (*AtPIMT1*) e frumento, mentre in cece la proteina corrispondente è composta da 229 residui. In Figura 3 è mostrato l'allineamento della proteina dedotta in HA89, con le sequenze aminoacidiche ottenute nelle altre specie vegetali. Nella figura inoltre sono state evidenziate le due regioni caratteristiche delle isoaspartil metiltransferasi, rinvenute anche in girasole: Pre-region I (TISAPMHMA) e Post-region III (RYVPLT), il cui ruolo sembra essere legato al mantenimento della specificità per il substrato (Kagan et al., 1997a). La sequenza della proteina PIMT isolata in questo lavoro, inoltre, contiene i tre domini condivisi con la maggior parte delle metiltransferasi AdoMet dipendenti, designati come I, II, e III, e ritenuti fondamentali per legare la S-adenosil metionina (Kagan e Clarke, 1994).

Per quanto riguarda l'affinità con le proteine di *Arabidopsis*, la specie filogeneticamente più vicina, PIMT in HA89 presenta una elevata omologia di sequenza (75%) con AtPIMT1, mentre inferiore è quella con AtPIMT2 (72 e 70% di omologia, rispettivamente con le varianti di *splicing* psi e omega). Un elevato grado di similarità è stato riscontrato anche nei confronti della sequenza della proteina da cece (CaPIMT1 75%) e frumento tenero (TaPIMT1 69%).

Un elevato grado di omologia nella sequenza proteica di questo enzima è già stato riscontrato anche tra organismi appartenenti a diversi *phyla* (Kagan et al., 1994). Si ipotizza, infatti, che la capacità di trasferire selettivamente un gruppo metile sul carbossile in β dei residui di L-isoaspartile, lasciando immutati i gruppi carbossilici in α dei residui normali di L-aspartile, possa imporre una considerevole "costrizione evolutiva" (Kagan et al., 1997a).

4.2 ANALISI DELLA VARIABILITA' DI SEQUENZA

4.2.1 AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO

L'analisi PCR del DNA delle 16 linee inbred di girasole ha prodotto ampliconi specifici della lunghezza di circa 550, 800 e 600 pb che, una volta sequenziati e integrati, hanno permesso di ottenere le sequenze del gene. L'amplificazione del primo e del terzo frammento è stata condotta con successo in tutti e 16 i genotipi, mentre quella del secondo è fallita in tre genotipi (RHA374, RHA464 e INRA-293), producendo una banda addizionale spuria e rendendo necessario progettare un primer *forward* leggermente più

avanzato per ottenere una amplificazione specifica della parte centrale del gene.

L'analisi comparativa delle sequenze nelle 16 accessioni è stata condotta su una regione genica di 1441 pb comprendente gli esoni II – IV e gli introni II e III,),

75 pb dell'introne I e 66 pb del 3' UTR.

A causa dello slittamento della polimerasi nelle regioni di poli (A/T) situate nell'introne II e III, per il secondo e terzo frammento non è stato possibile ottenere sequenze completamente allineate e perciò i polimorfismi in essi presenti sono stati confermati ripetendo il sequenziamento. Inoltre, poiché le regioni mononucleotidiche superavano la lunghezza critica (11 pb), gli eventuali polimorfismi di lunghezza rilevati a loro carico non sono stati considerati in quanto ritenuti non affidabili.

Da un attento esame dei dati grezzi di sequenza (cromatogrammi) relativi alle 16 linee *inbred* non si sono evidenziati casi di eterozigosi per nessuno dei polimorfismi rilevati.

4.2.2 VARIABILITÀ GENETICA DELLA SEQUENZA NUCLEOTIDICA

Dall'esame della sequenza nelle 16 accessioni si sono evidenziati in totale 10 siti polimorfici, di cui 6 per singolo nucleotide e 4 per inserzione/delezione (INDEL) (Figura 4). Quattro degli SNP rilevati si trovano in regioni codificanti, esoni II e III, e 2 nell'introne II; tutte le INDEL sono concentrate nella parte centrale dell'introne II, in un intervallo

di circa 150 pb; nessun polimorfismo è stato rinvenuto nel 3'UTR (Tabella 6).

La Tabella 7 riporta, per SNP e INDEL, il numero di polimorfismi, quello di aplotipi e gli indici di diversità genetica tra le accessioni calcolati per l'intera sequenza e, separatamente, per la porzione codificante (CDS), quella intronica e quella non codificante in 3'. Per quanto concerne gli SNP, considerando l'intera sequenza, i polimorfismi rilevati corrispondono in media a 1 ogni 240.1 pb, una densità considerevolmente inferiore a quella riscontrata negli stessi genotipi per il gene *HaDhn1* (1 SNP ogni 54.8 pb), che codifica una deidrina facente parte delle LEA (*Late Embryogenesis Abundant*; Battistini, 2011). Liu e Burke (2006), studiando nove geni in sedici genotipi di girasole, hanno rilevato una frequenza media di mutazione più elevata (1 SNP/38.8 pb) di quella qui riscontrata per il gene *PIMT*, benché con valori estremamente variabili per i diversi geni (1 SNP ogni 16,9 o 460,0 pb). Occorre comunque rilevare che il materiale genetico preso in considerazione da quegli autori era probabilmente caratterizzato da una base genetica più ampia, essendo costituito, oltre che da linee migliorate, da razze locali.

Piuttosto inaspettatamente, tali polimorfismi sono stati più frequenti nella regione codificante (1 SNP/173.2 pb) che in quella intronica (1 SNP/343 pb). Anche il valore di diversità nucleotidica ($\pi = 0,0011$), calcolato per l'intera sequenza, risulta decisamente più basso sia rispetto a quello determinato per *HaDhn1* nelle stesse accessioni ($\pi = 0.0087$; Battistini, 2011), che a quanto riportato in lavori precedenti per sei cultivar ($\pi = 0.0084$; Natali et al., 2003) o otto linee inbred ($\pi = 0.0150$; Giordani et al.,

2010) di girasole. La diversità nucleotidica nella regione intronica esaminata presenta un valore di π (0,0010) leggermente inferiore a quello stimato per la regione codificante ($\pi = 0,0013$), mentre il 3' UTR ha una diversità nucleotidica pari a zero.

I dati riportati in letteratura sui polimorfismi di sequenza in ambito vegetale mostrano in genere valori di π mediamente compresi tra 0.0020 e 0.033. Categorie diverse di geni possono presentare differenti livelli di variabilità di sequenza in relazione alle pressioni selettive che hanno subito nel corso dell'evoluzione (Bakker et al., 2008). In particolare, geni che codificano per proteine coinvolte nelle vie di regolazione tendono a essere meno variabili di quelli per proteine o enzimi con una funzione metabolica. Per esempio, livelli molto bassi di diversità nucleotidica si sono riscontrati in girasole (Liu e Burke, 2006) per calcione sintasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e un modulatore di risposta alle gibberelline (valori di π pari, rispettivamente, a 0,0006, 0,0009 e 0,0008); livelli sempre contenuti si sono rilevati in fattori di trascrizione MYB in orzo ($\pi = 0.0022$) e frumento ($\pi = 0.0027$; Haseneyer et al., 2008), e in varie molecole segnale e modulatori della trascrizione (in media $\pi = 0.0060$) in girasole (Liu e Burke, 2006; Giordani et al., 2010). Al contrario, un elevato livello di variabilità è documentato in geni codificanti la glucosio-6-fosfato isomerasi ($\pi = 0.0091$) la glutatione S-transferasi ($\pi = 0.0122$) in girasole (Liu e Burke, 2006), e l'alcol deidrogenasi in cinque diverse specie (π medio = 0.0174) (Cummings e Clegg, 1998). Un valore estremamente alto di diversità nucleotidica è stato riportato, infine, per una LTP (*Lipid Transfer Protein*; $\pi = 0.0332$) in girasole (Giordani et al., 2010). Il test di Tajima's (D) effettuato considerando separatamente le due

porzioni, codificante e non codificante, indica che le mutazioni riscontrate in questo studio si possono considerare selettivamente neutrali.

Gli INDEL rilevati, presenti tutti nel secondo introne, consistono in inserzioni di una singola base (1), di tre basi (1) e di nove basi (2) (Figura 4). Il valore di diversità nucleotidica stimato per gli INDELS è comunque molto basso ($\pi = 0,0013$).

Piuttosto inaspettamente non si sono riscontrati SNP o INDEL nelle 66 pb sequenziate che fanno parte del 3' UTR. Ciò suggerisce che possa essere particolarmente importante mantenere l'omologia degli elementi specifici (NUE, *Near upstream element* e FUE, *Far Upstream Element*), coinvolti nel processamento del trascritto (Rothnie, 1996).

Per quanto riguarda i polimorfismi nella regione codificante, le sostituzioni sinonime non producono modificazioni della sequenza aminoacidica, mentre queste avvengono nel caso di mutazioni non sinonime (*missense*). Dei 4 SNPs rinvenuti nella regione codificante, 3 sono sostituzioni non sinonime: una mutazione sinonima ed una *missense* sono presenti nella porzione N-terminale (rispettivamente in posizione 132 e 223), mentre le altre due non sinonime si trovano nel dominio centrale (in posizione 340 e 427). Nessun polimorfismo è stato rinvenuto nel dominio C-terminale sull'esone IV. L'elevata incidenza di mutazioni non sinonime suggerisce che alcune porzioni del gene possano essere sottoposte a selezione positiva, come già osservato in girasole per i geni della glutatione S-transferasi (Liu e Burke, 2006) e ABP1 (*Auxin Binding Protein*) (Giordani et al., 2010). Tuttavia è importante rilevare che nessuna mutazione missense interessa le regioni

altamente conservate e caratteristiche della isoaspartil metiltransferasi (Pre-region I e Post-region III).

L'andamento della diversità nucleotidica nelle diverse regioni della sequenza analizzata nelle 16 linee di girasole, è rappresentato in Figura 5.

4.2.3 VARIABILITÀ GENETICA DELLA SEQUENZA AMINOACIDICA

La Figura 6 mostra l'allineamento delle sequenze dedotte della proteina PIMT nelle 16 linee in studio, la risultante sequenza consenso, le varianti aminoacidiche rilevate e gli aplotipi individuati.

La mutazione nella porzione N-terminale coinvolge la sostituzione Glutamina/Acido glutammico (Gln/Glu) (residuo 75 della sequenza proteica, posizione 223 della codificante) ed è caratterizzante l'aplotipo 1 rappresentato dalle accessioni HA89 e HA89*. Questa sostituzione coinvolge due aminoacidi polari di struttura simile, ma la glutamina, per la presenza del gruppo amminico invece del carbossilico, rispetto all'acido glutammico non ha una carica netta. Entrambi i residui inoltre sono spesso incontrati nei siti attivi o di legame delle proteine: in questo caso è degno di nota che questa mutazione, pur non essendo inserita esattamente all'interno della zona coinvolta nel riconoscimento del substrato (Pre region I, residui 63-71) si trova comunque nelle sue strette vicinanze.

Le altre due sostituzioni aminoacidiche, identificate nel dominio centrale del peptide, consistono nelle varianti valina/isoleucina (Val/Ile, residuo 114 della sequenza proteica, posizione 340 della codificante) e le varianti alanina/treonina (Ala/Thr, residuo 143 della sequenza proteica, posizione

427 della codificante). La sostituzione (Val/Ile), comune agli aplotipi 1 e 2 (INRA-293) potrebbe sembrare a prima vista irrilevante in quanto porta a un cambiamento conservativo, sostituendo cioè un amminoacido con un altro appartenente alla medesima categoria biochimica (entrambi i residui sono neutri e apolari). Tuttavia è opportuno sottolineare che questo polimorfismo, comune nella popolazione umana (Ingrosso et al., 1989; Tsai e Clarke, 1994), è stato caratterizzato dal punto di vista funzionale. Negli eritrociti, la forma di PIMT contenente Ile-119 sembra avere un'attività specifica più alta del 20% rispetto alla forma contenente Val-119 (David et al., 1997). Recentemente l'attività specifica inferiore di PIMT Val-119 è stata ricondotta a un più basso tasso di scambio AdoMet:AdoHcy rispetto alla variante Ile-119 (Rutherford e Daggette, 2009), che risulterebbe inoltre più termo-tollerante e meno sensibile allo stress ossidativo (David et al., 1997). D'altra parte, attraverso lo studio di mutanti *knockout* in topo, è stato dimostrato che l'enzima contenente Val-119 è caratterizzato da un'affinità per il substrato endogeno superiore del 30% (DeVry e Clarke, 1999) e che questa caratteristica incide sulla capacità di riparare residui danneggiati di isoaspartile. Pertanto, a dispetto della maggiore attività specifica di PIMT Ile-119, sembra essere l'affinità per il substrato ad influenzare maggiormente il tasso di recupero delle proteine difettose. Questi dati suggeriscono l'ipotesi che la combinazione di entrambe le caratteristiche possa determinare la massima efficienza del meccanismo di riparazione (Rutherford e Daggette, 2009). In uno studio condotto su una popolazione di Ebrei Ashkenaziti è stato rilevato che il 65% degli individui in buona salute in età avanzata portava entrambe le varianti, facendo ipotizzare un

vantaggio dell'eterozigote (DeVry e Clarke, 1999). Come sopra indicato, tuttavia, nei materiali in esame non si è evidenziata eterozigosi ad alcuna posizione polimorfica.

Si tratta invece di variante non conservativa quella riscontrata nel genotipo INRA-293 alla posizione 143, laddove la treonina, polare, sostituisce l'alanina, apolare. Questa è, dopo la glicina, l'amininoacido più piccolo; d'altra parte la treonina è stericamente piuttosto ingombrante e per la sua polarità viene riscontrata spesso sulla superficie delle proteine, dove il suo gruppo ossidrilico, facilmente reattivo, è capace di formare legami idrogeno. Il risultato finale del cambiamento determinato da questa mutazione dipenderà probabilmente dall'abilità dei residui circostanti di stabilizzare le interazioni tra le catene laterali.

Le principali caratteristiche della proteina per i tre aplotipi sono riportate nella Figura 7. Peso molecolare e punto isoelettrico differiscono solo leggermente tra gli aplotipi in relazione alla composizione aminoacidica lievemente diversa, variando tra 26,72 e 26,76 kDa il primo, e tra 5,6 e 5,8 unità di pH il secondo. La possibile struttura secondaria della isospartil metiltransferasi in girasole è stata predetta mediante il programma HNN; Essa appare composta per quasi il 50% da disposizioni *random coil*, che suggeriscono la presenza di zone a conformazione piuttosto disordinata, zone a conformazione ad α -elica per circa il 37%, e una buona percentuale (circa il 15%) di *extended strand*, che partecipano nella formazione dei foglietti β .

Per studiare il possibile effetto della variazione nucleotidica osservata sulle caratteristiche biochimiche e biofisiche della proteina dedotta, sono state

prese in considerazione le proprietà intrinseche dei singoli aminoacidi nelle posizioni polimorfiche. Ad oggi non è ancora stata determinata la struttura cristallografica della proteina PIMT in un vegetale, ma per l'elevata omologia di sequenza di tutte le isoaspartil-metiltransferasi, possono essere usate come riferimento le informazioni sulle strutture tridimensionali già ottenute. La prima struttura cristallografica descritta per questo enzima, appartenente al batterio ipertermofilo *Thermatoga marittima* (Skinner et al., 2000), e quelle successive ottenute in *Pyrococcus furiosus* (Griffith et al., 2001), *Sulfolobus tokodaii* (Tanaka et al., 2004), *Drosophila melanogaster* (Bennet et al., 2003), e nell'uomo (Smith et al., 2002; Ryttersgaard et al., 2002), predicono una struttura di tipo $\alpha\beta$, consistente in sette foglietti β connessi da α -eliche. È interessante notare, a questo proposito, che la presenza dell'isoleucina in posizione 114, negli aplotipi 1 e 3, determinerebbe la formazione di un foglietto β , al posto di una conformazione disordinata (*random coil*) che si osserva invece in presenza della valina (Figura 8).

4.3 SAGGI REAL TIME PER LO STUDIO DI ESPRESSIONE DI PIMT

La quantificazione relativa mediante PCR *real time* è approccio molto potente, in termini di sensibilità e specificità, per misurare l'espressione di un gene di interesse. È essenziale perciò massimizzare la riproducibilità dell'esperimento attraverso un accurato controllo qualità delle varie fasi, dallo sviluppo del saggio, all'analisi dei dati (Nolan et al., 2006; Udvardi et al., 2008; Guenin et al., 2009).

Al fine di analizzare l'espressione di *PIMT* tramite PCR quantitativa *real time*, è stato sviluppato un saggio, altamente specifico per il relativo trascritto, basato sull'amplificazione di una regione propria della sequenza codificante. I primer progettati non hanno generato alcun prodotto visibile in gel di agarosio quando utilizzati per amplificare DNA genomico (dati non mostrati), in quanto il *forward* era stato concepito per appaiarsi sulla giunzione tra gli esoni 3 e 4 che si viene a formare solo dopo il processo di *splicing* del trascritto. Ricerche in banche dati hanno fornito le informazioni di sequenza relative ai geni *reference actina1*, *elongation factor1* ed *S19*, che hanno permesso, attraverso il medesimo approccio, di sviluppare anche per questi saggi *real time* da utilizzarsi nella quantificazione relativa dell'espressione. La conferma dell'elevata specificità dei saggi per il trascritto si è ottenuta mediante analisi *real time*: i profili di dissociazione dei prodotti PCR al termine della reazione di amplificazione mostrano un picco di fluorescenza ben distinto, ad indicare la presenza di un singolo amplicone. La Figura 10 mostra le curve di *melting* dei saggi sviluppati per *PIMT* e per i *reference ef1* e *S19*, caratterizzati da temperature di dissociazione molto simili, comprese tra 81,7 e 83,0°C. Eventuali prodotti di amplificazione spuri, qualora presenti, si sarebbero evidenziati come ulteriori picchi; in particolare, amplificati generati da DNA genomico, di maggiore lunghezza perché contenenti porzioni introniche, avrebbero mostrato picchi con temperature di *melting* maggiori.

In linea con le pratiche oggi prevalenti (Bustin et al., 2009) la quantificazione relativa dell'espressione è stata effettuata utilizzando due geni *reference*. I *reference* candidati sono stati valutati in un esperimento

preliminare, utilizzando come stampo cDNA rappresentativi dei diversi trattamenti sperimentali analizzati successivamente nel lavoro. Il confronto a coppie tra ciascun gene candidato e il *BestKeeper index* (Plaffl et al., 2004) ha evidenziato buoni livelli di correlazione pari a $r = 0,88$ per l'*actina*, e $r = 0,96$ per *EF1* ed *S19*. Pertanto, alla luce di questi risultati, i geni *EF1* ed *S19* sono stati scelti come *reference*.

Infine, preliminarmente agli esperimenti di quantificazione, per ciascun saggio impiegato è stata determinata l'efficienza di amplificazione che è risultata sempre molto elevata e vicina al valore teorico, e cioè 1,98, 2,01 e 2,02, rispettivamente per *EF1*, *P1MT* e *S19*. Tali valori sono stati successivamente utilizzati nella quantificazione relativa dell'espressione del gene *P1MT* mediante software GENORM.

4.4 EFFETTO DI AGING E PRIMING SULLA QUALITA' FISIOLOGICA E SULL'ESPRESSIONE DI P1MT NEL SEME

4.4.1 TEST FISIOLOGICI

4.4.1.1 ANOVA E DESCRIZIONE DEI DATI

Poiché la correlazione tra i valori di TMG e T_{50} determinata sull'intero set di dati è risultata elevata ($r = 0,94$ $P < 0,001$), nelle elaborazioni si è fatto riferimento solamente al T_{50} come misura del tasso di germinazione. L'analisi della varianza (Tabella 8) ci restituisce un quadro dei risultati piuttosto complesso data la significatività (spesso $P < 0,001$) di quasi tutte le

fonti di variazione analizzate (effetti principali ed interazioni di 1° e 2° ordine). Non significativi risultano soltanto l'effetto medio del *priming* e l'interazione "linee x *aging*" relativamente alla germinazione finale.

Nella media dei trattamenti (dati non mostrati), si sono osservate differenze significative tra le linee per germinabilità e velocità di germinazione; nel primo caso i valori erano compresi tra 68,8 e 99,0%, nel secondo tra 32,4 e 92,2 h. Considerato come effetto principale, come atteso l'invecchiamento accelerato ha determinato una flessione, benché lieve, della germinazione finale (-4,6%), ed un incremento, anche questo piuttosto contenuto, del T_{50} (+7,8 h). In valore assoluto, l'entità della variazione sul tempo di germinazione (+ 16,2%) è stata maggiore rispetto a quella della germinabilità (-5,3%), ad indicare che il trattamento applicato (40°C per 72 h) sembra riprodurre in maniera piuttosto verosimile gli effetti del deterioramento naturale, senza tuttavia ridurre drasticamente la vitalità del seme. D'altra parte, l'effetto medio del *priming* è stato quello di ridurre il T_{50} in maniera piuttosto rilevante (-14.7 h), corrispondente ad una variazione pari a -24%. Tuttavia, data la significatività delle interazioni, che indicano per i genotipi in esame reattività diverse all'*aging* ed al *priming*, è stato necessario considerare gli effetti semplici di tali trattamenti sulle variabili osservate.

La Tabella 9 riporta i valori di germinabilità finale osservati per le 16 linee nelle quattro combinazioni di trattamenti. Per quanto riguarda i controlli non trattati, i livelli più elevati sono stati mostrati dalle linee RHA419, RHA426 e RHA464 (tutte al 99%), mentre all'estremo inferiore dell'ambito di variazione, si sono collocate le linee CRA-16UPR, INRA-107, RHA265 e

UNUPI-GB2112, con valori di germinabilità finale significativamente inferiori, intorno al 70%. È interessante notare che le tre linee ad elevata germinabilità sopra menzionate hanno mantenuto una elevata performance anche a seguito di *aging* con o senza *priming*, mentre il *ranking* dei rimanenti genotipi in termini di germinabilità è risultato piuttosto variabile nei diversi trattamenti. Differenze significative tra genotipi sono rilevabili per ogni condizione sperimentale analizzata.

Se si considera la rapidità di germinazione (Tabella 10), nel controllo non trattato i risultati migliori in termini di T_{50} sono stati evidenziati da INRA-295, INRA-293, RHA374, INRA-306, e CRA-216/3-4, mentre il peggiore risultato si è registrato per CRA-16UPR. In base a questi valori di T_{50} , le prime accessioni sopra indicate possono essere ritenute ad alto vigore (43-44 h), CRA-16UPR a basso vigore (82 h), le rimanenti a vigore medio (53-69 h). Tra le linee con valori più estremi di T_{50} tuttavia, solo INRA-295 e CRA-16UPR hanno manifestato comportamenti simili nei vari trattamenti, posizionandosi la prima costantemente tra le più veloci, la seconda tra le più lente.

Si sono riscontrate analogie tra rapidità e percentuale di germinazione per campioni sottoposti a solo *priming* ($r = -0,80$ P 0,001) e per quelli sottoposti a *priming* dopo *aging* ($r = -0,51$ P 0,05).

4.4.1.2 ANALISI DEGLI EFFETTI SEMPLICI

Data la significatività delle interazioni tra i diversi fattori, per la valutazione dei risultati si è fatto riferimento ai loro effetti semplici. Nella Tabella 11 sono riportati, per ciascun genotipo, le variazioni in termini di germinabilità

e T_{50} come effetto dell'*aging* rispetto al campione non trattato, o del *priming* rispetto sia al campione non trattato che dopo *aging*.

Il trattamento di solo *aging* ha inciso lievemente sul valore di germinazione finale, con una riduzione media pari a 2,2 punti percentuali. Alcune accessioni (CRA-216/3-4, INRA-109, HA89, INRA-293) hanno manifestato riduzioni di germinabilità maggiori, intorno al 10%, non discostandosi tuttavia in maniera significativa dalle altre. Anche sul T_{50} l'effetto è stato di scarsa entità, con un incremento medio pari a 4,8 h; lievi riduzioni di tale tempo, che suggerirebbero un'influenza benefica del trattamento, si sono verificate in alcuni casi, e potrebbero essere attribuite all'effetto positivo dell'imbibizione del seme posto ad elevata UR durante l'*aging*, che avrebbe permesso un anticipo della germinazione. Per INRA-293 e INRA-306 si sono registrati incrementi del T_{50} (rispettivamente pari a 35,8 e 39,6 h) statisticamente maggiori di quelli osservati per le altre linee. È interessante notare che il genotipo INRA-293, uno di quelli maggiormente danneggiati dall'*aging*, sia a livello di germinazione finale che di T_{50} , rappresenta un aplotipo distinto del gene *PIMT*. Per quanto riguarda il T_{50} , non si evidenzia alcuna correlazione dei valori del controllo con quelli registrati dopo *aging* ($r = 0,36$; n.s.), né con la variazione dovuta al solo *aging* ($r = -0,45$; n.s.), ad indicazione che il tasso di germinazione nel controllo non è predittivo dell'effetto dell'*aging*.

Il solo *priming* ha inciso debolmente sul valore di germinazione finale, determinando un aumento medio pari a 4,4 punti percentuali. Le linee che hanno tratto maggior beneficio da questo trattamento sono RHA265, CRA-216/3 e UNIPI-GB2112, con un incremento del dato finale rispettivamente

di 21, 17 e 13 punti percentuali, senza discostarsi tuttavia in maniera significativa dalle altre accessioni, che hanno mostrato incrementi minori. Sul T_{50} l'effetto di questo trattamento è stato più apprezzabile, con una riduzione media pari a 17,7 h; nei diversi genotipi tuttavia, l'entità della risposta è stata varia, portando a una diminuzione del T_{50} , rispetto al non trattato, variabile da circa 6 a 41 h. Le accessioni che hanno beneficiato maggiormente del *priming*, RHA419 e RHA464 (rispettivamente -41,4 e -37,8 h) erano state identificate come linee ad alto vigore in quanto non deteriorate dall'*aging* (vedi il punto precedente). D'altra parte, una rilevante diminuzione del T_{50} si registra anche nelle linee INRA-293 e INRA-306, che però hanno risentito maggiormente dell'effetto dell'*aging*. Le linee INRA-107 e INRA-109, al contrario, hanno fatto registrare un aumento del T_{50} , pari rispettivamente a 23,9 e 10,8 h, che le ha distinte in maniera significativa dalle altre accessioni. Riguardo alla velocità di germinazione, i valori di T_{50} del controllo sono risultati correlati in maniera significativa ($r = 0,70$; $P = 0,01$) con quelli ottenuti a seguito di *priming*, ma non con la variazione dovuta al *priming* ($r = 0,25$; n.s.), ad indicazione che la velocità di germinazione iniziale non è predittiva del potenziale effetto invigorente del trattamento.

Il trattamento di *priming* dopo *aging*, non ha praticamente fatto variare il valore medio di germinazione finale (-0,8%), rispetto a quello raggiunto dagli stessi genotipi sottoposti al solo *aging*. Solamente in CRA-16UPR, si è verificata una ulteriore riduzione piuttosto consistente, pari a 26 punti percentuali, benché non significativamente diversa dalla variazione della maggior parte delle altre linee. Analogamente a quanto si osserva nel seme

non sottoposto ad *aging*, l'effetto medio del *priming* applicato dopo l'invecchiamento accelerato ha comportato una riduzione del valore di T_{50} (-11,7 h). Tuttavia, anche in questo caso, i genotipi hanno risposto in maniera diversa al trattamento, con variazioni dei valori di T_{50} tra -38,0 a +45,3 h, benché nella maggioranza dei casi l'effetto sia stato favorevole. Tra le linee che hanno tratto beneficio dal *priming* dopo l'*aging*, come evidenziato per il solo *priming* troviamo RHA426 e INRA-293 che hanno fatto registrare i decrementi di T_{50} maggiori, pari rispettivamente a 37,2 e 38,0 h, benché non significativamente diversi da quelli osservati per le altre linee. Al contrario, su INRA-306 e CRA-16UPR il *priming* dopo *aging* ha prodotto un notevole ed inaspettato aumento dei valori di T_{50} , che le ha differenziate in maniera significativa dalle altre accessioni. Queste due linee rappresentano i soli genotipi nei quali il trattamento di *priming* sembra non alleviare gli effetti deleteri dell'*aging*.

Riguardo al T_{50} , i valori delle linee invecchiate artificialmente hanno mostrato un buon livello di correlazione ($r = 0,78$; $P 0,01$) con quello delle accessioni sottoposte ad *aging* e *priming*; anche la correlazione degli stessi valori con l'effetto del *priming* dopo *aging* è risultata significativa ($r = 0,52$; $P 0,01$), ma è diventata praticamente nulla quando CRA-16UPR e INRA-306, i genotipi per i quali è stata rilevata una interazione *aging* x *priming* molto elevata, sono stati esclusi dall'analisi. Ciò sembra suggerire che per la maggior parte dei genotipi il *priming* abbia un effetto positivo generico non commisurato con l'entità del danno dell'invecchiamento.

Alla luce di questi dati, si può considerare che, nelle condizioni praticate, l'effetto dell'*aging* sia stato piuttosto blando, evidenziandosi solo per due

linee (INRA-293 e INRA-306) una apprezzabile perdita di vigore; per le stesse linee, e nella maggioranza dei casi, l'effetto del solo *priming* è stato quello atteso, cioè di invigorazione, con aumento della germinabilità e della velocità di germinazione. In generale il *priming*, quando attuato dopo l'*aging*, ha avuto effetto positivo; ciò è avvenuto anche nel caso di INRA-293, mentre su INRA-306, l'altra linea che più ha risentito dell'*aging*, pare avere accentuato il danno dell'invecchiamento. Tale ulteriore danno del *priming*, tuttavia, non pare attribuibile a fenomeni di marcescenza che si ritiene potrebbero insorgere su semi già indeboliti dall'*aging*, poiché per INRA-306 non si è rilevata perdita di germinabilità finale, ma solo un consistente rallentamento. Marcescenza degli acheni potrebbe essersi verificata invece nel caso di CRA-16UPR in cui, oltre all'aumento del T_{50} , si è osservata una apprezzabile diminuzione della vitalità.

4.4.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL GENE PIMT

4.4.2.1 ANOVA E DESCRIZIONE DEI DATI

Per i medesimi campioni di seme sottoposti alle quattro situazioni sperimentali sopra descritte, e per i quali è stata determinata la qualità fisiologica, è stato stimato il livello di espressione di *PIMT*. La determinazione è stata effettuata utilizzando come unità di misura il livello di espressione osservato in un campione con funzione di calibratore, rappresentato dal cDNA ottenuto da seme non trattato della linea HA89, ed espressa come *fold change* (FC) rispetto a tale campione.

Anche in questo caso l'analisi della varianza (Tabella 12) fornisce un quadro dei risultati piuttosto complesso, data l'elevata significatività di tutte le fonti

di variazione analizzate (effetti principali ed interazioni di 1° e 2° ordine). Considerati in termini di effetti principali (dati non mostrati), sia l'*aging* che il *priming* hanno determinato entrambi una flessione dell'espressione del gene *PIMT*, riducendo in media il *fold change* rispettivamente di 1,5 e 0,6 unità. In termini percentuali, la variazione dovuta ad *aging* (-44%) è stata maggiore rispetto a quella dovuta a *priming* (-19%), ad indicare che in media il primo trattamento ha inciso di più del secondo sulla presenza dei trascritti.

La Tabella 13 riporta i livelli di espressione osservati per le 16 linee nei diversi trattamenti. Una considerevole variabilità per espressione di *PIMT* nel seme quiescente (secco, non trattato) è stata osservata tra i genotipi analizzati. Nella quasi totalità delle rilevazioni, i valori più bassi si sono registrati per HA89, il cui campione non trattato era stato scelto casualmente come calibratore (FC = 1); è degno di nota che, la medesima tesi, HA89*, accessione di diversa provenienza della stessa linea, ha mostrato un livello di espressione molto simile (0,9), come altrettanto simili tra le due accessioni sono stati i valori di FC rilevati negli altri trattamenti. Diversi altri genotipi (RHA426, RHA265, CRA-16UPR, INRA-295, RHA294, RHA419 e RHA374) hanno mostrato un accumulo di trascritti del gene significativamente più elevato rispetto al calibratore, con valori di FC compresi tra 4,3 e 14,1. Tuttavia, per quest'ultimo valore, relativo alla linea RHA426, si è rilevato un errore elevato a causa della discordanza tra le due repliche. La Figura 10 rappresenta graficamente la presenza dei trascritti di *PIMT* nelle 16 linee e nei diversi trattamenti rispetto al calibratore. La forte riduzione di FC a seguito di invecchiamento ha prodotto un notevole

appiattimento della variabilità tra genotipi, non riscontrandosi tra essi differenze significative; differenze piuttosto ampie tra linee si sono evidenziate invece nei livelli di espressione a seguito di *priming*, sia da solo che dopo *aging*.

4.4.2.2 ANALISI DEGLI EFFETTI SEMPLICI

Data la significatività delle interazioni messe in luce dall'ANOVA, che indicano per i genotipi in esame risposte diverse all'*aging* ed al *priming*, è stato necessario considerare gli effetti semplici di tali trattamenti sulle variabili osservate.

Nella Tabella 14 sono riportate, per ciascun genotipo, le variazioni in termini di *fold change* come effetto dell'*aging* o del *priming* rispetto al campione non trattato, o come effetto del *priming* dopo *aging* rispetto al campione con solo *aging*. A seguito del solo invecchiamento accelerato, la quasi totalità dei genotipi ha mostrato una drastica riduzione nell'espressione del gene *PIMT*, che si è tradotta in un decremento medio dei valori di FC pari a 2,5 unità; tuttavia, nei singoli genotipi, l'entità della diminuzione è stata molto variabile. RHA426 ha fatto registrare un decremento di FC (-12,2) statisticamente maggiore di quello osservato per le altre linee; anche per INRA-295 e RHA265, che nel controllo avevano valori di espressione elevati, la riduzione è stata considerevole (rispettivamente pari a 5,5 e 5,3). Nelle due accessioni di HA89 l'*aging* non ha causato una diminuzione nell'espressione del gene, bensì un lievissimo aumento (rispettivamente 0,22 e 0,42), ancorché non significativamente diverso da quello di altri genotipi. È degno di nota che, a livello della proteina, le due accessioni sono caratterizzate da un aplotipo a parte; inoltre condividono con INRA-293 la

mutazione Iso/114, che negli eritrociti umani determina un minore suscettibilità allo stress ossidativo.

Anche il *priming* da solo ha prodotto un decremento medio dei trascritti del gene *PIMT*, seppure più lieve di quello dell'*aging* (FC -1,6); il calo maggiore, di entità superiore a quello osservato per le altre linee pur considerando l'entità dell'errore associato, si è registrato ancora per RHA426 (-12,8). Il *range* degli effetti dovuti al *priming* è stato relativamente ampio, anche se in pochi casi questi sono stati significativamente diversi tra le linee.

Il trattamento di *priming* effettuato dopo l'*aging* ha incrementato mediamente i valori di FC dello 0,4, con variazioni comprese tra -1,1 (HA89* e RHA464) e 5,2 unità (CRA-16UPR, linea in cui si osserva il maggiore recupero rispetto all'*aging*. In termini generali si può dunque osservare che, sebbene a seguito di *priming* si registrino livelli del trascritto *PIMT* inferiori rispetto seme quiescente, questo trattamento sul seme deteriorato sembra re-indurre l'espressione del gene, seppur in maniera lieve e diversa a seconda dei genotipi .

E' opportuno evidenziare, infine, che l'espressione di *PIMT* nel seme dopo il solo trattamento di *priming*, correla fortemente con quella ove il *priming* ha seguito l'*aging* ($r = 0,90$; $P 0,001$). Possiamo quindi ritenere che, nonostante l'espressione di *PIMT* nei diversi genotipi sia influenzata in maniera differente dal *priming*, lo stesso genotipo risponde in maniera simile a questo trattamento invigorente, sia in condizioni normali, sia dopo il deterioramento imposto dall'*aging*.

1.1.1 ESPRESSIONE DI PIMT, GERMINABILITÀ E VIGORE

La Tabella 15 riporta le correlazioni tra variabili fisiologiche e livello di espressione genica entro i diversi trattamenti. Germinabilità e T_{50} sono risultati, come atteso, sempre inversamente correlati, benché abbiano raggiunto la soglia di significatività solamente in risposta al *priming*, sia da solo ($r = -0,80$; $P 0,001$) che applicato dopo *aging* ($r = -0,51$; $P 0,05$), evidenziando in questo modo la capacità del trattamento di influenzare positivamente la performance del seme in termini di germinazione. Passando ad esaminare le relazioni tra variabili fisiologiche e la quantità di trascritto di *PIMT*, nel seme quiescente e in quello invecchiato artificialmente non si sono rilevate correlazioni significative. D'altra parte il FC è risultato correlato negativamente con la germinabilità ($r = -0,57$; $P 0,05$) in seguito a solo *priming* e con la germinabilità e il T_{50} (rispettivamente $r = -0,55$ e $r = 0,49$; $P 0,052$) in seguito a *priming* dopo *aging*. Tali evidenze, che escluderebbero un atteso parallelismo tra l'abbondanza di trascritti e l'elevato vigore, potrebbero d'altra parte essere indicative di una risposta cellulare in termini di *repair* attiva nelle condizioni fisiologiche create dal *priming*. L'espressione di *PIMT* potrebbe cioè segnalare tali condizioni senza peraltro che la sua presenza abbia un immediato impatto positivo sulla germinabilità.

Si ritiene opportuno tuttavia segnalare una modesta correlazione ($r = 0,47$; $P 0,068$), ancorché non significativa, tra il livelli di espressione di *PIMT* nel seme secco e la germinabilità dopo *aging*. In tal caso l'elevato livello nel seme quiescente potrebbe indicare una buona condizione fisiologica del seme che lo renderebbe capace di tollerare più facilmente lo stress dell'invecchiamento. Allo stesso modo i valori di *fold change* dopo

invecchiamento accelerato correlano moderatamente ($r = 0,52$; $P 0,05$) con l'effetto dell'*aging* sulla germinazione finale. Sulla base di questi dati, tuttavia, non si può escludere che in girasole l'accumulo di trascritti di *PIMT* possa influire positivamente sulla capacità del seme di rimanere vitale in condizioni che favoriscono il deterioramento. Le condizioni di *aging* applicate in questo studio, forse eccessivamente blande, potrebbero non essere state adeguate per evidenziare eventuali differenze di risposta al trattamento. In *Arabidopsis*, utilizzando mutanti ottenuti per transgenesi, è stata documentata una stretta connessione tra l'accumulo della proteina PIMT1 nel seme maturo e il vigore e la vitalità del seme dopo trattamenti invecchiamento accelerato (Ogè et al., 2008).

Nella maggioranza degli studi condotti su *PIMT*, gli effetti negativi dell'*aging* sulla qualità fisiologica del seme sono stati correlati alla diminuzione dell'attività enzimatica (Ayyappan et al., 2006; Kester et al. 1997). I risultati qui riportati sono in generale accordo con quelli dei lavori condotti sulle altre specie nelle quali è stata studiata l'espressione del gene, i quali evidenziano che il seme secco costituisce il sito di massimo accumulo dei trascritti (Mudgett e Clarke, 1994; Verma et al., 2010). Questo aspetto è stato certamente confermato in questa indagine, che tuttavia ha rivelato l'esistenza di una notevole variabilità di espressione tra genotipi, non emersa precedentemente da altri studi di tipo fisiologico dove era analizzato un solo genotipo. Questa informazione potrà risultare utile nella scelta dei materiali per la conduzione di studi mirati a elucidare il ruolo di questo enzima nella qualità del seme.

La riduzione generalizzata, ed in alcuni casi drastica, del livello di espressione a seguito dell'*aging*, a cui tuttavia non ha corrisposto una analoga riduzione della qualità fisiologica, né in termini di correlazione, né in termini di valori medi di queste variabili (solo blanda per il T_{50} , estremamente ridotta per la germinabilità), potrebbe essere considerata una conseguenza dell'imbibizione, più che un effetto deleterio del trattamento di invecchiamento artificiale. Anche questa osservazione sarebbe in linea con la riduzione del livello di espressione di *PIMT* a seguito di imbibizione riportata per le altre specie (Mudgett e Clarke, 1994).

La riduzione nell'efficienza dei meccanismi di riparazione degli acidi nucleici a seguito di invecchiamento accelerato è ampiamente documentata (Elder et al., 1987; Bray e West, 2005; Kranner et al., 2010a), mentre il ruolo svolto da quelli di riparazione proteica ha ricevuto meno attenzione. In girasole, in particolare, gli studi finora condotti si sono riferiti quasi esclusivamente agli effetti deleteri dell'*aging* sui sistemi di detossificazione dal danno ossidativo (Bailly et al 1996, 1998, 2002).

L'incremento della germinabilità finale e del tasso di germinazione, osservati dopo *osmopriming* da solo o dopo *aging*, hanno confermato l'efficacia dell'approccio per aumentare il vigore del seme. Gli effetti benefici del *priming*, documentati in molte specie, tra cui anche girasole (Chojnowski et al., 1997; Bailly et al., 2000), sono stati messi in relazione all'instaurarsi dei processi metabolici della germinazione, all'aumento dell'attività di vari sistemi antiossidanti e, in particolare quando è implicata la longevità del seme, all'attivazione di meccanismi di riparazione (Ashraf e Bray, 1993, Soeda et al., 2005). In questo lavoro, l'accumulo dei trascritti di *PIMT* nei

diversi trattamenti non suggerisce un coinvolgimento di questo meccanismo di riparazione nell'effetto invigorente osservato. D'altra parte, il *pattern* dell'espressione del gene sembra simile a quello verificato per altri trascritti o proteine con provata funzione protettiva (quali LEA, deidrine, CAT e SOD) che sarebbero più strettamente coinvolte nella protezione dal deterioramento durante la conservazione. Queste, accumulate essenzialmente durante la fase di disseccamento, vengono degradate quando il seme è parzialmente idratato durante l'*osmopriming* o nelle prime fasi della germinazione (Capron et al., 2000; Chen e Arora, 2011). Inoltre, A supporto di questa tesi, è rilevante che questo meccanismo di riparazione proteica sia particolarmente vantaggioso in condizioni di bassa o nulla attività metabolica, come quelle del seme quiescente, in cui non è possibile rimpiazzare le proteine danneggiate mediante sintesi *de novo* in relazione alle limitate disponibilità energetiche.

5. CONCLUSIONI

I) Isolamento e caratterizzazione della sequenza genomica di *PIMT* in girasole

In questo lavoro è stata descritta per la prima volta la sequenza genomica della L-isoaspartil O-metiltransferasi (*PIMT*) in girasole, primo caso anche nella famiglia delle Compositae. La regione isolata consiste in totale di 2.230 pb e comprende una parte codificante, di tre esoni, e una non codificante, di due introni, insieme alla sequenza non codificante 3'-UTR. Non è stato possibile identificare con esattezza il I esone del gene, che nelle altre specie vegetali analizzate è costituito solamente da sei nucleotidi, e che qui non sono stati rilevati nelle oltre 600 basi a monte del II esone. Condotti ulteriori accertamenti si procederà a depositare la sequenza in GenBank.

La proteina *PIMT* dedotta dalla sequenza codificante è composta da 230 aminoacidi, contiene le regioni caratteristiche delle isoaspartil metiltransferasi e presenta elevata omologia con *PIMT1* di *Arabidopsis*.

II) Analisi della variabilità genetica di *PIMT* nelle 16 linee inbred

Quello qui riportato è il primo caso di valutazione della diversità intraspecifica per questo gene nei vegetali. Un basso livello di diversità nucleotidica, sia della regione codificante che della regione non codificante, è stato rilevato nelle accessioni considerate. Nella regione codificante sono state rinvenute tre mutazioni puntiformi non sinonime, determinanti altrettanti cambiamenti aminoacidici. Tuttavia, nessuna sostituzione è risultata interessare le regioni altamente conservate e coinvolte nel riconoscimento del substrato. Successive analisi bioinformatiche potranno fornire predizioni sugli effetti di tali mutazioni sulla funzionalità enzimatica.

Ciò nondimeno, una di esse, concernente la sostituzione tra valina e isoleucina, è stata rilevata anche in altre specie dove sembra connessa, allo stato eterozigote, con la resistenza a stress ossidativi.

III) Caratterizzazione fisiologica delle linee in risposta ad *aging* e *priming*

In generale i trattamenti di *aging* e *priming* hanno prodotto gli effetti attesi sulla germinabilità e sulla velocità di germinazione. L'invecchiamento accelerato ha portato una diminuzione, seppur lieve, della velocità di germinazione, mentre il *priming* ne ha prodotto nella media un aumento, anche a seguito di *aging*. Tuttavia la significatività delle interazioni rilevate indica risposte fisiologiche diverse dei genotipi ai trattamenti.

IV) Analisi dell'espressione del gene *PIMT* in risposta ad *aging* e *priming*

I risultati ottenuti indicano una notevole variabilità nei livelli di espressione del gene *PIMT* in funzione del genotipo e dei trattamenti applicati. I maggiori livelli di espressione sono stati rilevati nel seme quiescente, mentre il trattamento di *aging* e, in minor misura, quello di *priming* hanno prodotto generalmente una diminuzione dei trascritti; quest'ultimo tuttavia sembra capace di riattivare, in semi sottoposti a *aging*, una certa espressione del gene. Anche per l'espressione del gene, come per le variabili fisiologiche, la risposta ai trattamenti risulta genotipo-dipendente; ciò sottolinea l'importanza di considerare tale variabilità nelle indagini su questi aspetti di fisiologia del seme. L'elevato livello di trascritti *PIMT* nel

seme secco qui rilevato è in accordo con quanto riportato per altre specie. In maniera simile, altre biomolecole a funzione protettiva, accumulate nella fase di maturazione e disseccamento, raggiungono i massimi livelli nel seme secco.

Nel seme quiescente e in quello invecchiato artificialmente la quantità di trascritto di *PIMT* non è correlata con la germinabilità e la velocità di germinazione. A seguito di *priming* tali correlazioni sono negative, e portano pertanto a escludere un ruolo di questo meccanismo di riparazione nell'invigorazione che si osserva con il *priming*. Tuttavia, in base alla modesta correlazione tra livello di trascritti nel seme secco e germinabilità dopo *aging*, si può ipotizzare per *PIMT* un qualche contributo in termini di tolleranza all'invecchiamento.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aalen R.B.** (1999). Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. *Seed Sci. Res.* 9: 285-295.
- Abdalla F.H. and Roberts E.H.** (1968). The effects of temperature and moisture on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad bean and pea during storage. *Ann. Bot. (Lond)* 32: 119-136.
- Ahmad Q., Rana M.A. and Siddiqui S.U.H.** (1991). Sunflower seed yield as influenced by some agronomic and seed characters. *Euphytica*, 56(2): 137-142.
- Ahmad S.** (2001). Environmental effects on seed characteristics of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *J. Agron. Crop Sci.* 187: 213-216.
- Al-Chaarani G.R., Gentzbittel L., Huang X.Q. and Sarrafi A.** (2004). Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theor. Appl. Genet.* 109:1353-1360.
- Almoguera C. and Jordano J.** (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low molecular-weight heat-shock protein and LEA mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 19: 781-792.
- Anastasi U., Santonoceto C., Giuffre A.M., Sortino O., Gresta F. and Abbate V.** (2010). Yield performance and grain lipid composition of standard and oleic sunflower as affected by water supply. *Field Crops Res.* 119(1): 145-153.
- Apel K. and Hirt H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Argerich C.A. and Bradford K.J.** (1989). The effects of priming and ageing on seed vigour in tomato. *J. Exp. Bot.* 40: 599-607.

Argerich C.A., Bradford K.J. and Tarquis A.M. (1989). The effects of priming and ageing on resistance to deterioration of tomato seeds J. Exp. Bot. 40: 593-598.

Aswad D.W. (1984). Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. J. Biol. Chem. 259:10714-21.

Aswad D.W., Paranandi M.V. and Schurter B.T. (2000). Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 21: 1129-1136.

Ayyappan V., Andy G., Natesan S., Won Choi C., and Markandan M. (2006). Changes in L-isoaspartyl Methyltransferase, storage components and anti-oxidant enzymes activities during accelerated ageing in Cucumber (*Cucumis sativus L.*) seeds. Journal of Plant Sciences 3: 228-239.

Bailly C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14: 93-107.

Bailly C., Audigier A., Ladonne F., Wagner M.H. Coste F., Corbineau F. and Côme D. (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. J. Exp. Bot. 52: 701-708.

Bailly C., Benamar A., Corbineau F. and Côme D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. Physiol. Plant. 97: 104-110.

Bailly C., Benamar A., Corbineau F. and Côme D. (1998). Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiol. Plantarum* 104: 646-652.

Bailly C., Benamar A., Corbineau F. and Côme D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds as affected by priming. *Seed Sci. Res.* 10: 35-42.

Bailly C., Bogatek-Leszczynska R., Côme D. and Corbineau F. (2002). Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Sci. Res.* 12: 47-55.

Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H. and Corbineau F. (2008). From intracellular signalling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biologies* 331: 806-814.

Bailly C., Leymarie J., Lehner A., Rousseau S., Côme D. and Corbineau F. (2004). Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J. Exp. Bot.* 55(396): 475-483.

Bailly C., Leymarie J., Rousseau S., Come D., Feutry A. and Corbineau F. (2003). Sunflower seed development as related to antioxidant enzyme activities. In Nicolas G., Bradford K.J., Come D., and Pritchard H.W. (eds.) *The biology of seeds: Recent research advances*. CABI publishing, Wallingford and New York. 69-75.

Baker E.H., Bradford K.J., Bryant J.A. and Rost T.L. (1995). A comparison of desiccation-related proteins (dehydrin and QP47) in peas (*Pisum sativum*). *Seed Sci. Res.* 5: 185-193.

- Bakker E.G., Traw M.B., Toomajian C., Kreitman M. and Bergelson J.** (2008). Low levels of polymorphism in genes that control the activation of defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 178: 2031-2043.
- Baskin C.C. and Baskin J.M.** (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, California. 666.
- Basra A.S.** (1995). *Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications*. The Haworth Press, Inc., NY.
- Basset G., Raymond P., Malek L. and Brouquisse R.** (2002). Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. Evidence for an in vivo oxidation of the proteasome. *Plant Physiol.* 128: 1149-1162.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F. and Covarrubias A.A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148: 6-24.
- Bennett E.J., Bjerregaard J., Knapp J.E., Chavous D.A., Friedman A.M., Royer W.E. Jr and O'Connor C.M.** (2003). Catalytic Implications from the *Drosophila* Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Structure and Site-Directed Mutagenesis. *Biochem.* 42: 12844-12853.
- Bentsink L., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D., Tesnier K., Groot S.P.C. and Koornneef M.** (2000). Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1595-1604.

- Bentsink L., Jowett J., Hanhart C.J. and Koornneef M.** (2006). Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 17042-17047.
- Betty M., Finch-Savage W.E., King G.J. and Lynn J.R.** (2000). Quantitative genetic analysis of seed vigor and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. New Phytol. 148: 227-286.
- Bewley J.D.** (1986). Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDonald M.B., Nelson Jr. and C.J. (eds.) Physiology of Seed Deterioration, Crop Science Society of America Inc. 27-45.
- Bewley J.D. and Black M.** (1994). Seeds: Physiology of development and germination (2nd edition). New York, Plenum.
- Blackman B. K., Scascitelli M., Kane N.C., Luton H.H., Rasmussen D.A., Bye R.A., Lentz D.L. and Rieseberg L.H.** (2011). Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (doi: 10.1073/pnas.1104853108).
- Bowler C., Van Montagu M. and Inzé D.** (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.
- Bradford K.J.** (1986). Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. HortScience 21: 1105-1112.
- Bray C.M., Davison P.A., Ashraf M. and Taylor R.M.** (1989). Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. Ann. Bot. 63, 185-193.

Bray C.M. and West C.E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol.* 168: 511-528.

Burke M.J. (1986). The glassy state and survival of anhydrous biological systems. A.C. Leopold (Ed.), *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*, Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 358-363.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J and Wittwer C.T. (2009) The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622.

Cakmak T., Atici O., Agar G. and Sunar S. (2010). Natural aging-related biochemical changes in alfalfa (*Medicago Sativa* L.) seeds stored for 42 years. *Int. Res. J. Plant Sci.* 1(1): 1-6.

Campbell S.A. and Close T.J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* 137: 61-74.

Capron I., Corbineau F., Dacher F., Job C., Côme D. and Job D. (2000). Sugarbeet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of LEA proteins. *Seed Sci. Res.* 10: 243-254.

Catusse J., Meinhard J., Job C., Strub J.M., Fischer U., Pestsova E., Westhoff P., Van Dorselaer A. and Job D. (2011). Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. *Proteomics* 11: 1569-80.

Cellier F., Conejero G., Breitler J.C. and Casse F. (1998). Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiol.* 116: 319-328.

Chang B.S., Beauvais R.M., Dong A. and Carpenter J.F. (1996). Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 331: 249-258.

Chastain T.G., Ward K.J. and Wysocki D.J. (1995). Stand establishment responses of soft white winter-wheat to seedbed residue and seed size. *Crop Sci.* 35: 213-218.

Chavous D.A. (2001). Overexpression of protein carboxyl methyltransferase extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. Ph.D.thesis, Biology Dept., Boston College, Chestnut Hill, MA.

Chen K. and Arora R. (2011). Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*), *Plant Sci.* 180: 212-220.

Chen K., Fessehaie A. and Arora R. (2012). Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: possible role in stress tolerance. *Plant Sci.* Feb. :27-36.

Chen T., Nayak N., Majee S.M., Lowenson J., Schafermeyer K.R., Eliopoulos A.C., Lloyd T.D., Dinkins R., Perry S.E., Forsthoefel N.R., Clarke S.G., Vernon D.M., Zhou Z.S., Rejtar T. and Downie A.B. (2010). Substrates of the *Arabidopsis thaliana* protein isoaspartyl

methyltransferase 1 identified using phage display and biopanning. *J. Biol. Chem.* 285: 37281-92.

Chojnowski M., Corbineau F. and Côme D. (1997). Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. *Seed Sci. Res.* 7: 323-331.

Clarke S. (2003). Aging as war between chemical and biochemical processes; protein methylation and the recognition of age damaged proteins for repair. *Ageing Res. Rev.* 2: 263-285.

Clarke L.A., Rebelo C.S., Goncalves J., Boavida M.G. and Jordan P. (2001). PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol. Path.* 54: 351-353.

Clerkx E.J.M., Blankestijn-De Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C. and Koornneef M. (2004a). Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 121: 448-461.

Clerkx E.J.M., El-Lithy M.E., Vierling E., Ruys G.J., Blankestijn-De Vries H., Groot S.P.C., Vreugdenhil D. and Koornneef M. (2004b). Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakhara, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol.* 135: 432-443.

Close T.J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97: 795-803.

Coca M., Almoguera C. and Jordano J. (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and

persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* 25: 479-492.

Comai L., Dietrich R., Maslyar D., Baden C. and Harada J. (1989). Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L. *Plant Cell* 1: 293-300.

Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G. (2000). NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS.* 25(3):147-150. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html

Côme D. and Corbineau F. (1996). Metabolic damage related to desiccation sensitivity. In: Ouédraogo A.S.S., Poulsen K., Stubsgaard F. (eds.) *Intermediate/Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds*, IPGRI, Roma. 107-120.

Copeland L.O. and McDonald M.B. (1995). *Seed Science and Technology*. 3rd Edition. Chapman and Hall, NY. 409.

Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16(22): 10881-10890.

Costa R.M.A., Morgante P.G., Berra C.M., Nakabashi M., Bruneau D., Bouchez D., Sweder K.S., Van Sluys M.A. and Menck C.F.M. (2001). The participation of AtXPB1, the XPB/RAD25 homologue gene from *Arabidopsis thaliana*, in DNA repair and plant development. *Plant J.* 28: 385-395.

Cottage A., Yang A., Maunders H., De Lacy R.C. and Ramsay N.A. (2001). Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCRwalking. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 321-327.

- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. and Aurell Wistrom C.** (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242: 1-10.
- Crowe J.H., Hoekstra F.A. and Crowe L.M.** (1992). Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* 54: 570-599.
- Cruz-García F., Jiménez L.F. and Vázquez-Ramos J.M.** (1995). Biochemical and cytological studies in osmoprimed maize seeds. *Seed Sci. Res.* 5, 15-23.
- Cummings M.P. and Clegg M.T.** (1998). Nucleotide sequence diversity at the alcohol dehydrogenase 1 locus in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*): an evaluation of the background selection hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5637-5642.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. and Scheible W.-R.** (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 5-17.
- David C.L., Keener J. and Aswad D.W.** (1999) Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability. *J. Bacteriol.* 181: 2872-2877.
- D'Angelo S., Ingrosso D., Perfetto B., Baroni A., Zappia M., Lobianco L.L., Tufano M.A. and Galletti P.** (2001). UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1-9.
- De Castro R.D., Van-Lammeren A.A.M., Groot S.P.C., Bino R.J. and Hilhorst H.W.M.** (2000). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and

formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiol.* 122: 327-335.

De Tullio M.C. and Arrigoni O. (2003). The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Sci. Res.* 13: 249-260.

De Vos C.H.R., Lieke H. and Bino R.J. (1994). Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. *Physiol. Plant.* 92: 131-139.

DeVry C.G. and Clarke S. (1999). Polymorphic forms of the Protein L-isoaspartate (D-Aspartate) methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins. *J. Hum. Genet.* 44: 275-288.

Debeaujon I., Leon-Kloosterziel K.M. and Koornneef M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 403-413.

Delouche JC and Baskin CC. (1973). Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* 1: 427-452.

DeRocher A. and Vierling E. (1994). Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J.* 5: 93-102.

Desrosiers R.R., Romanik E.A. and O'Connor C.M. (1990). Selective carboxyl methylation of structurally altered calmodulins in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 21368-21374.

Devaiah S.P., Pan X.Q., Hong Y.Y., Roth M., Welti R. and Wang X.M. (2007). Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50: 950-957.

Deverman B.E., Cook B.L., Manson S.R., Niederhoff R.A., Langer E.M., Rosova I., Kulans L.A., Fu X., Weinberg J.S., Heinecke J.W.,

- Roth K.A. and Weintraub S.J.** (2002). Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 111: 51-62.
- Dinkins R.D., Majee S.M., Nayak N.R., Martin D., Xu Q., Belcastro M.P., Houtz R.L., Beach C.M., and Downie A.B.** (2008). Changing transcriptional initiation sites and alternative 5' and 3' splice site selection of the first intron deploys *Arabidopsis* protein isoaspartyl methyltransferase 2 variants to different subcellular compartments. *Plant J.* 55: 1-13.
- Drake S.K., Bourdon E., Wehr N.B., Levine R.L, Backlund P.S., Yergey A.L and Rouault T.A.** (2002) Numerous proteins in Mammalian cells are prone to iron-dependent oxidation and proteasomal degradation. *Dev. Neurosci.* 24: 112-124.
- Dunlop R.A., Rodgers K.J. and Dean R.T.** (2002). Recent development in the intracellular degradation of oxidized proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 894-906.
- Dure L.** (1993). Structural motifs in LEA proteins. In Close T.J. and Bray E.A. (eds.) *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 91-103.
- Elder R.H., Dell'Aquila A., Mezzina M., Sarasin A. and Osborne D.J.** (1987) DNA ligase in repair and replication in the embryos of rye, *Secale cereale*. *Mutat. Res.* 181: 61-71.
- Ellis R. J.** (1993). The general concept of molecular chaperones. *Phil. Trans.R. Soc. London.* 339: 257-261.
- Ellis R.H. and Roberts E.H.** (1980). Improved equations for prediction of seed longevity. *Ann. Bot.* 45: 13-30.

- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z. and Ben-Hayyim G.** (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 100: 234-240.
- Fang P., Li X., Wang J., Xing L., Gao Y., Niu L., Teng M.** (2010) Crystal structure of the protein L-isoaspartyl methyltransferase from *Escherichia coli*. *Cell Biochem. Biophys.* 58: 163-167.
- Feder M.E. and Hofmann G.E.** (1999). Heatshock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61: 243–282.
- Fernandez P., Di Rienzo J.A., Moschen S., Dosio G.A.A., Aguirrezábal L.A.N., Hopp H.E., Paniego N., and Heinz R.A.** (2010). Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. *Plant Cell Rep.* 30: 63-74.
- Fick G.N.** (1976). Genetics of floral colour and morphology in sunflowers. *The J. Hered.* 67: 227-230.
- Fick G.N.** (1978) Sunflower breeding and genetics. In: Carter J.F. (ed.) *Sunflower science and technology*. ASA, CSSA and SSSA, Madison. 279-327.
- Fick G.N. and Miller J.F.** (1997). The genetics of sunflower. In: Shneither A.A. (ed.) *Sunflower technology and production*. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. 441–495.
- Flagella Z., Rotunno T., Tarantino E., Di Caterina R. and De Caro A.** (2002). Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *Eur. J. Agron.* 17: 221-230.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

(2009). <http://faostat.fao.org>.

Foolad M.R., Lin G.Y. and Chen F.Q. (1999). Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* 118: 167-173.

Fuller M., Diamond J. and Applewhite T. (1967). High oleic sunflower oil. Stability and chemical modification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44: 264-267.

Gallardo K., Job C., Groot S.P.C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J. and Job D. (2001) Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126: 835-848.

Gallardo K., Job C., Groot S.P.C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J. and Job D. (2002b). Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiol. Plant.* 116: 238-247.

Gallardo K., Job C., Groot S.P.C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J. and Job D. (2002a). Proteomics analysis of *Arabidopsis* seed germination: a comparative study of wild-type and GA-deficient seeds. *Plant Physiol.* 129: 823-837.

Gao Y.P., Young L., Bonham-Smith P., Gusta L.V. (1999). Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Mol. Biol.* 40: 635-44.

Garnczarska M. and Wojtyla L. (2008). Ascorbate and glutathione metabolism in embryo axes and cotyledons of germinating lupine seeds, *Biol. Plant.* 52: 681-686.

Garcés R., García J.M. and Mancha M. (1989). Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 28: 2597-2600.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. and Bairoch A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. and Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Walker J.M. (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. Copyright Humana Press.

George-Nascimento C., Lowenson J., Borissenko M., Calderon M., Medina-Selby A., Kuo J., Clarke S. and Randolph A. (1990). Replacement of a labile aspartyl residue increases the stability of human epidermal growth factor. *Biochem.* 29: 9584-9591.

Ghezzi P. and Bonetto V. (2003). Redox proteomics: Identification of oxidatively, modified proteins. *Proteomics* 3:1145-53.

Giordani T., Buti M., Natali L., Pugliesi C., Cattonaro F., Morgante M. and Cavallini A. (2010). An analysis of sequence variability in eight genes putatively involved in drought response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 122(6): 1039-49.

Giordani T., Natali L., D'Ercole A., Pugliesi C., Fambrini M., Vernieri P., Vitagliano C. and Cavallini A. (1999). Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABAdeficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Mol. Biol.* 39: 739-748.

- Grappin P., Colleta B., Yang H., Jalleta D., Ogé L., and Zubarev R.** (2011). New proteomic developments to analyze protein isomerization and their biological significance in plants. *J. Proteomics* 74: 1475-1482
- Griffith S.C., Sawaya M.R., Boutz D.R., Thapar N., Katz J.E., Clarke S. and Yeates T.O.** (2001). Crystal structure of a protein repair methyltransferase from *Pyrococcus furiosus* with its L-isoaspartyl peptide substrate. *J. Mol. Biol.* 313: 1103-1116.
- Guan L.M. and Scandalios J.G.** (2002). Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiol. Plant.* 114: 288-295.
- Guénin S., Mauriat M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C. and Gutierrez L.** (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp. Bot.* 60: 487-493.
- Gulli M., Rampino P., Lupotto E., Marmioli N. and Perrotta C.** (2005). The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small hsp gene in barley and maize. *J. Cereal Sci.* 42: 25-31.
- Gutiérrez G., Cruz F., Moreno J., González-Hernández V.A. and Vázquez-Ramos J.M.** (1993) Natural and artificial seed ageing in maize: Germination and DNA synthesis. *Seed Sci. Res.* 3: 279-285.
- Haddadi P., Yazdi-samadi B., Naghavi M. R., Kalantari A., Maury P., Sarrafi A.** (2011). QTL analysis of agronomic traits in recombinant inbred lines of sunflower under partial irrigation. *Plant Biotechnol. Rep.* DOI 10.1007/s11816-011-0164-5.

- Halliwell B.** (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312–22.
- Halmer P.** (2006). Priming – Technology. In: *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*. Eds. Black M., Bewley J.D., Halmer P. pp. 535-537 CABI Wallingford.
- Harrington, J.F.** (1972). Seed storage and longevity. In: Kozlowski T.T. (ed.) *Seed Biology*. Volume III. New York and London, Academic Press.
- Harter A.V., Gardner K.A., Falush D., Lentz D.L., Bye R.A. and Rieseberg L.H.** (2004). Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature* 430: 201-205.
- Hattendorf, M.J., Redelfs, M.S., Amos, B., Stone, L.R. and Gwin, R.E.** (1988). Comparative water use characteristics of six row crops. *Agron. J.* 80: 80-85.
- Heiser C.B.JR.** (1954). Variation and subspeciation in the common sunflower, *Helianthus annuus*. *Am. Midl. Nat.* 51: 287-305.
- Heiser C.B.JR.** (1978). Taxonomy of *Helianthus* and Origin of Domesticated Sunflower. In: Carter J. F. (ed.) *Sunflower Science and Technology*. *Agron.* 19: 31-53.
- Hendry G.A.F.** (1993). Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Sci. Res.*, 3: 141-153.
- Heydecker W. and Coolbear P.** (1977). Seed treatments to improve performance-survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.* 5: 353-425.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. and Buitink J.** (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 431–438.

Hughes D. and Galau G. (1989). Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes Dev* 3: 358–369.

Hughes D. and Galau G. (1991). Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell* 3: 605–618.

Hunt L., Holdsworth M.J. and Gray J.E. (2007). Nicotinamidase activity is important for germination. *Plant J.* 51: 341–351.

Ingrosso D., Cimmino A., D'Angelo S., Alfinito F., Zappia V. and Galletti P. (2002). Protein methylation as a marker of aspartate damage in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes: role of oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 269: 2032-2039.

Ingrosso D., Fowler A.V., Bleibaum J. and Clarke S. (1989) Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 264: 20131-20139.

Jan C.C. and Seiler G.J. (2007). Sunflower. In: Singh R.J. (ed.) *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Oilseed Crops.* CRC Press, Boca Raton. 103-165.

Jiang, W., Lee, J., Jin, Y.M., Qiao, Y., Piao, R., Jang, S.M., Woo, M.O., Kwon, S.W., Liu, X., Pan, H.Y. and Koh H.J. (2011). Identification of QTLs for seed germination capability after various storage periods using two RIL populations in rice. *Mol. Cells* 31, 385-392.

- Job C., Kersulec A., Ravasio L., Chareyre S., Pepin R. and Job D.** (1997) The solubilization of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming. *Seed Sci. Res.* 7: 225-243.
- Johnson B.A., Langmack E.L. and Aswad D.W.** (1987). Partial repair of deamidation- damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 262: 12283-12287.
- Joosen R.V.L., Arends D., Willems L.A.J, Ligterink W., Jansen R. C. and Hilhorst H.W.M.** (2012). Visualizing the genetic landscape of *Arabidopsis* seed performance. *Plant Physiol.* 158: 570-589.
- Kagan R.M. and Clarke S.** (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 417-427.
- Kagan R.M., McFadden H.J., Mc Fadden P.N., O'Connor C. and Clarke S.** (1997a). Molecular phylogenetics of a protein repair methyltransferase. *Comp. Biochem. Physiol.* 117: 379-385.
- Kagan R.M., Niewmierzycka A. and Clarke S.** (1997b). Targeted gene disruption of the *Caenorhabditis elegans* L-isoaspartyl protein repair methyltransferase impairs survival of dauer stage nematodes. *Arch. Biochem. Biophys.* 348: 320-328.
- Kester S.T., Geneve R.L. and Houtz R.L.** (1997) Priming and accelerated ageing affect L-isoaspartyl methyltransferase activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *J. Exp. Bot.* 48: 943-949.

Kibinza S., Bazin J., Bailly C., Farrant J.M., Corbineau F. and El-Maarouf-Bouteau H. (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Sci.* 181:309-15.

Kibinza S., Vinel D., Côme D., Bailly C. and Corbineau F. (2006). Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiol. Plant.* 128: 496-506.

Kolkman J.M., Slabaugh M.B., Bruniard J.M., Berry S., Bushman B.S., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J.F., Leon A., and Knapp S.J. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159.

Kranter I., and Grill D. (1993). Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea-seeds. *Physiol. Plant.* 88: 557-562.

Kranter I., Beckett R.P., Wornik S., Zorn M. and Pfeifhofer H.W. (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant J.* 31: 13-24.

Kranter I., Birtić S., Anderson K.M. and Pritchard H.W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic. Biol. Med.* 40: 2155-2165.

Kranter I., Roach T., Beckett R.P., Whitaker C. and Minibayeva F.V. (2010a). Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* 167: 805-811.

- Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P. and Seal C.E.** (2010b). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.* doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x.
- Kunce C.M. and Trelease R.N.** (1986). Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol.* 81: 1134-1139.
- Kutuk O. and Letai A.** (2008). Regulation of Bcl-2 family proteins by post translational modifications. *Curr. Mol. Med.* 8:102-18.
- Ladino C.A. and O'Connor C.M.** (1992). Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells. *J Cell Physiol.* 153: 297-304.
- Lanthier J., Bouthillier A., Lapointe M., Demeule M., Belivea, R. and Desrosiers R.R.** (2002). Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin. *J. Neurochem.* 83: 581-591.
- Lanteri S., Kraak H.L., Ric De Vos C.H. and Bino R.J.** (1993). Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annum*). *Phy. Plant.* 89: 433-440.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lawson W.R., Goulter K.C., Henry R.J., Kong G.A. and Kochman J.K.** (1998). Marker assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. *Mol. Breeding* 4: 227-234.

Leclercq P. (1969). Une stérilité male cytoplasmique chez le tournesol. Ann. Amel. Plant. 19: 99-106.

Lee Y.P., Baek K.-H., Lee H.-S., Kwak S.-S., Bang J.-W. and Kwon S.-Y. (2010). Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. J. Exp. Bot. 61: 2499-2506.

Lehner A., Bailly C., Flechel B., Poels P., Cume D. and Corbineau F. (2006). Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. J. Cereal Sci. 43: 175-182.

Lentz D.L., Pohl M.D., Alvarado J.L., Tarighat S. and Bye R. (2008). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. Proc Natl Acad Sci USA 105: 6232-6237.

Leon A.J., Andrade F.H. and Lee M. (2003). Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. Crop Sci. 43: 135-140.

Leonard J.M., Bollmann S.R. and Hays J.B. (2003). Reduction of stability of *Arabidopsis* genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function. Plant Physiol. 133: 328-338.

Leubner-Metzger G. (2005). β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. Plant J. 41: 133-145

Li J., Harper L.C., Golubovskaya I., Wang C.R., Weber D., Meeley R.B., McElver J., Bowen B., Cande W.Z. and Schnable P.S. (2007).

Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and DSBs repair. *Genetics* 176: 1469-1482.

Librado P. and Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lindner H., Sarg B., Grunicke H. and Helliger W. (1999). Age-dependent deamidation of H1(0) histones in chromatin of mammalian tissues. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 125: 182-186.

Liu A. and Burke J.M. (2006). Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics* 173(1): 321-330.

Liu Z., Hong S., Escobar M., Vierling E., Mitchell D., Mount D. and Hall J. (2003) Arabidopsis UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol.* 132:1405-1414.

Lofgren J.R. (1997). Sunflower for confectionery food, bird food, and pet food. In: Schneiter A.A. (ed.) *Sunflower technology and production.* American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, Wisconsin. 747-764.

Lowenson J.D. and Clarke S. (1992) Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyl transferase. Implication for the repair hypothesis. *J. Biol. Chem.* 267: 5985-5995.

Martin J.L. and McMillan F.M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethioinine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 783-793.

McDonald M.B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27: 177-237.

McDonald M.B. (1980). Assessment of seed quality. *Hort. Science* 15: 784-788.

McFadden P.N. and Clarke S. (1987). Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2595-2599.

Mestries E., Gentzbittel L., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P. and Vear F. (1998). Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol. Breeding* 4: 215-226.

Michel B.E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.* 72: 66-70.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Mokrani L., Gentzbittel L., Azanza F., Fitamant L., Al-Chaarani G. and Sarrafi A. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 149-156.

Mudgett M.B. and Clarke S. (1993). Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferase that may be involved in seed survival: purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme. *Biochem.* 32: 11100-11111.

Mudgett M.B. and Clarke S. (1994) Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *J. Biol. Chem.* 269: 25605-25612.

Mudgett M.B. and Clarke S. **(1996) A distinctly regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30: 723-737.**

Mudgett M.B., Lowenson J.D. and Clarke S. (1997). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants. Phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds. *Plant Physiol.* 115: 1481-1489.

Müller K., Linkies A, Vreeburg R.A.M., Fry S.C., Krieger-Liszkay A., and Leubner-Metzger G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress (*Lepidium sativum* L.) seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* 150: 1855-1865.

Murray Jr E.D. and Clarke S. (1984). Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues. *J. Biol. Chem* 259: 10722-32.

Murthy U.M.N and Sun W.Q. (2000). Protein modification by Amadori and Maillard reaction during seed storage: Roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 51: 1221-1228.

Najbauer J., Orpiszewski J., and Aswad D.W. (1996). Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo. *Biochem.* 35: 5183-5190.

- Nagel M. and Börner A.** (2009). The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 20: 1-12.
- Natali L., Giordani T. and Cavallini A.** (2003). Sequence Variability of a dehydrin gene within *Helianthus annuus*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 811-818.
- Natoli A., Gorni C., Chegiani F., Ajmone Marsan P., Colombi C., Lorenzoni C. and Marocco A.** (2002). Identification of QTLs associated with sweet sorghum quality. *Maydica* 47: 311-322.
- Nei M.** (1987). *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press: New York, NY.
- Nei, M. and Gojobori T.** (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- Nel A.A., Loubser H.L., and Hammes P.S.** (2002). Development and validation of relationships between sunflower seed quality and easily measurable seed characteristics for grading purposes. *S. Afr. J. Plant Soil* 19: 201-205.
- Nguyen A.T. and Donaldson R.P.** (2005). Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 439: 25-31.
- Nolan T., Hands R.E. and Bustin S.A.** (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1: 1559-1582.
- Obendorf R.L.** (1997). Oligosaccharides and galactosyls in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 7: 63-74.

Ogé L., Bourdais G., Bove J., Collet B., Godin B., Granier F., Boutin J.-P., Job D., Jullien M. and Grappin P. (2008). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3022-3037.

Osborne D.J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61: 3568-3577.

Ouvrard O., Cellier F., Ferrare K., Tusch D., Lamaze T., Dupuis J.-M. and Casse-Delbart F. (1996). Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol. Biol.* 31: 819-829.

Oracz K., El-Maarouf Bouteau H., Farrant J., Cooper K., Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F. and Bailly C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50: 452-465.

Patel K. and Borchardt R.T. (1990). Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* 7: 703-711.

Pepperkok R., Hotz-Wagenblatt A., König N., Girod A., Bossemeyer D. and Kinzel V. (2000). Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation. *J. Cell. Biol.* 148: 715-726.

Perez-Vich B., Knapp S.J., Leon A.J., Fernandez-Martinez J.M. and Berry S.T. (2004). Mapping minor QTL for increased stearic acid content in sunflower seed oil. *Mol. Breeding* 13: 313-322.

- Perna A., F. Ingrosso D., De Santo N.G., Galletti P. and Zappia V.** (1995). Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia. *Kidney International* 47: 247–253.
- Perry D.A.** (1984). Reports of the vigor test committee 1980-1983. *Seed Sci. Technol.* 12: 287-299.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C. and Neuvians T.P.** (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26: 509-515.
- Powell A.A.** (2006). Seed vigor and its assessment. In: Basra A.S (ed.) *Handbook of seed science and technology*. Food Products Press, The Harworth Press, Inc., New York.
- Powell A.A., Yule L.J., Jing H., Groot S.P.C., Bino R.J. and Pritchard H.W.** (2000). The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. *J. Exp. Bot.* 51: 2031-2043.
- Powell A.A. and Matthews S.** (1978). The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* 29: 1215-1229.
- Priestley D.A., Cullinan V.I. and Wolfe J.** (1985). Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Environ.* 8: 557-562.
- Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., and Carpenter J.F.** (1993). Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65: 661–671.

- Prieto-Dapena P., Castaño R., Almoguera C. and Jordano J.** (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.* 142: 1102-1112.
- Putt E.D.** (1997). Early history of sunflower. In: Schneiter A.A. (eds.) *Sunflower production and technology*. Madison, WI: American Society of Agronomy. 1-19.
- Quackenbush J., Cho J., Lee D., Liang F., Holt I., Karamycheva S., Parvizi B., Perteza G., Sultana R. and White J.** (2001). The TIGR gene indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Res.* 29: 159-164.
- Quackenbush J., Liang F., Holt I., Perteza G. and Upton J.** (2000). The TIGR gene indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 28: 141-145.
- Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C. and Job D.** (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141: 910-923.
- Rajjou L. and Debeaujon I.** (2008) Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biol.* 331: 796-805.
- Rajjou L., Duval M., Gallardo K., Catusse J., Bally J., Job C. and Job D.** (2012). Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* (in press).
- Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C. and Job D.** (2004). The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome

highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* 134: 1598-1613.

Rajjou L., Lovigny Y., Groot S.P.C., Belghazi M., Job C. and Job D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol.* 148:620-641.

Rao R.G.S., Singh P.M. and Rai M. (2006). Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. *Sci. Hortic.* 110: 1-6.

Robinson N.E. and Robinson A.B. (2001). Deamidation of human proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 12409-12413.

Robinson A.B., McKerrow J.H. and Cary P. (1970). Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 66: 753-757.

Roje S. (2006). S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Photochemistry* 67: 1686-1698.

Rorat T. (2006). Plant dehydrins: tissue location, structure and function. *Cell Mol. Biol. Lett.* 11: 536-556.

Rothnie H.M. (1996). Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol Biol* 32: 43-61.

Rutherford K. and Daggett V. (2009). The V119I polymorphism in protein L-isoaspartate O-methyltransferase alters the substrate-binding interface. *Protein Eng. Des. Sel.* 22: 713-721.

Ryttersgaard C., Griffith S.C., Sawaya M.R., MacLaren D.C., Clarke S. and Yeates T.O. (2002). Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 277: 10642-10646.

Sarocco F., Bino R.J., Bergervoet J.H.W. and Lanteri S. (1995). Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. *Seed Sci. Res.* 5: 25-29.

Sattler S.E., Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Pollard M. and DellaPenna D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16: 1419-1432.

Scandalios J.G., Guan L. and Polidoros A.N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. in Scandalios J.G. (ed.) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 343–406.

Schopfer P., Plachy C., and Frahry G. (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125: 1591-1602.

Schwember A.R. and K.J. Bradford. (2010). Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *J. Exp. Bot.* 61(15): 4423-4436.

Sen S. and Osborne D.J. (1974). Germination of rye embryos following hydration–dehydration treatments: enhancement of protein and RNA synthesis and earlier induction of DNA replication. *J. Exp. Bot.* 25: 1010-1019.

- Shen-Miller J., Mudgett M.B., Schopf J.W., Clarke S. and Berger R.** (1995). Exceptional seed longevity and robust growth: Ancient sacred lotus from China. *Am. J. Botany* 82: 1367-1380.
- Shih M.D., Hoekstra F.A., Hsing Y.I.C.** (2008). Late embryogenesis abundant proteins. In Kader J.-C. and Delseny M. (eds.) *Advances in Botanical Research*, Academic Press, Vol 48. 211–255.
- Shih M.D., Lin S.C., Hsieh J.S., Tsou C.H., Chow T.Y., Lin T.P. and Hsing Y.I.C.** (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Mol. Biol.* 56: 689-703.
- Schubert H.L., Blumenthal R.M. and Cheng X.** (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem.Sci.* 28: 329-335.
- Skinner M.M., Puvathingal J.M., Walter R.L. and Friedman A.M.** (2000). Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: A catalyst for protein repair. *Structure* 8: 1189-1201.
- Smirnoff N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.
- Snow A.A., Moran-Palma P., Rieseberg L.H., Wszelaki A. and Seiler G.J.** (1998). Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 85(6): 794-801.
- Soeda Y., Konings M.C.J.M., Vorst O., van Houwelingen A.M.M.L., Stoopen G.M., Maliepaard C.A., Kodde J., Bino R.J., Groot S.P.C. and van der Geest A.H.M.** (2005). Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of

progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* 137: 354-368.

Stacy R.A.P., Nordeng T.W., Culianez-Macia F.A. and Aalen R.B. (1999). The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J.* 19: 1-8.

Stougaard R.N. and Xue Q.W. (2004). Spring wheat seed size and seeding rate effects on yield loss due to wild oat (*Avena fatua*) interference. *Weed Sci.* 52: 133-141.

Sun W., Van Montagu M. and Verbruggen N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1577: 1-9.

Sun W.Q. and Leopold A.C. (1995). The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiol. Plant.* 94: 94-104.

Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

Tanaka Y., Tsumoto K., Yasutake Y., Umetsu M., Yao M., Fukada H., Tanaka I. and Kumagai I. (2004). How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein. Protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii*. *J. Biol. Chem.* 279: 32957-32967.

- Tarquis A.M. and Bradford K.J.** (1992). Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seed. *J. Exp. Bot.* 43: 307-317.
- Tekrony D.M. and Egli D.B.** (1997). Accumulation of seed vigour during development and maturation. *Curr. Plant Sci. Biot. Agric.* 30: 369-384.
- Thapar N., Kim A.K. and Clarke S.** (2001). Distinct patterns of expression but similar biochemical properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase in higher plants. *Plant Physiol* 125: 1023-1035.
- Tommasi F., Paciolla C, de Pinto M.C. and De Gara L.** (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 52: 1647-1654.
- Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Walser P., Roche S. and Vear F.** (2008). Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* 164: 433-444.
- Tsai W. and Clarke S.** (1994). Amino acid polymorphisms of the human L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase involved in protein repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 491-497.
- Udvardi M.K., Czechowski T. and Scheible W.-R.** (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20: 1736-1737.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. and Speleman F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3: 1-12.
- Van der Vossen H.A.M. and Mkamilo G.S.** eds. (2007). Plant resources of tropical Africa 14. Vegetable oils. Wageningen: PROTA Foundation.

- Vear F. and Miller J.** (1993) Sunflower. In Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology. OECD's Group of National Experts on Safety in Biotechnology ISBN 92-64-14047-6.
(<http://www.oecd.org/dataoecd/57/48/1946204.pdf>)
- Vázquez-Ramos J.M. and Sánchez M.D.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13: 113–130.
- Verma P., Singh A., Kaur H. and Majee M.** (2010). Protein L - isoaspartyl methyltransferase1 (CaPIMT1) from chickpea mitigates oxidative stress-induced growth inhibition of *Escherichia coli*. *Planta* 231: 329-336.
- Visick J.E., Cai H. and Clarke S.** (1998). The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of ageing *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses. *J Bacteriol* 180: 2623-2629.
- Vollmann J. and Rajcan I.** (Eds.) (2010). Oil Crops - Series: Handbook of Plant Breeding, Vol. 4 -, XII, 450 p., ISBN: 978-0-387-77593-7.
- Vranová E., Inzé D. and Van Breusegem F.** (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227–1236.
- Walters C.** (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8: 223-244
- Walters C.** (2004). Temperature dependency of molecular mobility in preserved seeds. *Biophys. J.* 86: 1253-1258
- Walters C., Wheeler L.M., Stanwood P.C.** (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiol.* 48: 229-244

- Walters C., Wheeler L.M. and Grotenhuis J.M.** (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci. Res.* 15: 1-20.
- Waterworth W.M., Masnavi G., Bhardwaj R.M., Jiang Q., Bray C.M. and West C.E.** (2010). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J.* 63: 848-860.
- Watterson G.A.** (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7: 256-276.
- Weber J.L. and Wong C.** (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123-1128.
- Wehmeyer N., Hernandez L.D., Finkelstein R.R. and Vierling E.** (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112: 747-757.
- Weise L., Shirasawa T. and Chattopadhyay D.** (2002). Crystal structure of human L-isoaspartyl- O-methyltransferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6-Å resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site. *Protein Science* 11: 625-635.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M. and Van Camp W.** (1995). Catalases in plants. *Mol. Breeding* 1: 207-228.
- Wills D.M. and Burke J.M.** (2006). Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Hered.* 97: 403-408.
- Wolfe J. and Bryant G.** (1999). Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiol.* 39: 103-129.

Xu Q., Belcastro M.P., Villa S.T., Dinkins R.D., Clarke S.G. and Downie A.B. (2004) A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in *Arabidopsis* produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus. *Plant Physiol.* 136: 2652-2664

Yang F., Basu T.K. and Oorailu B. (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52: 319-330.

Yin D. and Chen K. (2005). The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp. Gerontol.* 40: 455-465.

Zhao R., Oxley D., Smith T.S., Follows G.A., Green A.R. and Alexander D.R. (2007). DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH. *PloS Biol.* 5: e1.

Zhao R., Yang F.T. and Alexander D.R. (2004). An oncogenic tyrosine kinase inhibits DNA repair and DNA-damage-induced Bcl-xL deamidation in T cell transformation. *Cancer Cell* 5: 37-49.

Zhou Y., Chu P., Chen H., Li Y., Liu J., Ding Y., Tsang E.W.T., Jiang L., Wu K. and Huang S. (2012). Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in *Arabidopsis*. *Planta* 235: 523-537.

TABELLE

Tabella 1. Descrizione delle 16 linee *inbred* di girasole utilizzate.

Linea	Provenienza	Uso	Origine	Caratteristiche	Anno rilascio
CRA-16UPR	CRA	B	n.d.	n.d.	n.a.
CRA-216/3-4	CRA	B	n.d.	n.d.	n.a.
INRA-107	INRA	B	Incroccio con <i>H. argophyllus</i>	n.d.	1990
INRA-109	INRA	B	Marocco	n.d.	1975
INRA-293	INRA	C	Introggressione da <i>H. tuberosus</i>	<i>Branching</i> apicale	1985
INRA-295	INRA	C	Introggressione da <i>H. resinusus</i>	<i>Branching</i> apicale	1998
INRA-306	INRA	C	<i>H. petiolaris</i> ristoratore x Pop. Zambia	<i>Branching</i> apicale	1996
UNIPI-GB2112	UNIPI	C	Russia	<i>Branching</i> apicale	n.a.
HA89	NGRP	B	Selezione VNIIMK 8931	Ad alto olio. Resist. Ruggine	1985
HA89*	CRA	B	Selezione VNIIMK 8931	Ad alto olio. Resist. Ruggine	1985
RHA265	NGRP	C	2*Peredovik/953-102-1-1-41" T66006-2-1-3-1	Ad alto olio. Resist. Ruggine	1985
RHA294	NGRP	C	CMS PI343863/BONITA GIANT-MANCHURIAN /HA61/MENNONITE RR	Precoce. Non da olio. <i>Branching</i> . Resist. Peronospora.	1985
RHA374	NGRP	C	Argentina ARG-R43,	<i>Branching</i> apicale.	1991
RHA419	NGRP	C	RHA373/ARG1575-2 (cmsHA 89*3/ <i>H. argophyllus</i>)	<i>Branching</i> apicale. Resist. Peronospora.	2001
RHA426	NGRP	C	RHA409//RHA376*2/PUR (<i>H. annuus</i> selvatico)	<i>Branching</i> completo. Toll. Imidazolinonici.	2001
RHA464	NCSL	C	RHA418/RHA419/3/RHA 801//RHA 365/PI 413047	Alto contenuto olio. Resist. Ruggine e Peronospora.	2008

CRA = Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Sezione di Osimo, Ancona

INRA = Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont-Ferrand, Francia

UNIPI = Università di Pisa - Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Pisa

NGRP = National Genetic Resources Program, ARS, United States Department of Agriculture

NCSL = Northern Crop Science Laboratory, ARS, United States Department of Agriculture, Fargo,

B = mantenitrice della maschio-sterilità

C = ristoratrice della maschio-fertilità

n.d. non disponibile

Tabella 2. Lista dei *primer* utilizzati per isolare la sequenza parziale del gene *PIMT* in girasole, relative sequenze, temperature di *annealing* e lunghezza della sequenza ottenuta.

Primer	Sequenza (5' - 3')	T ¹	Amplicone (pb)
Fw1	ATGAAGCAATTCTGGGCAG	56	493
Rw1	GTAGCCACGCAGTTGG		nr
Fw20	CCTGGGATGCATGCTTTAG	58	235
Rw503	CGCAGTTGGGCTTCCCTA		249
FW518	GGGTACTTGACCGCATGTTT	58	142
Rw503	CGCAGTTGGGCTTCCCTA		249
Fw232	GCCTTAGAGGGGCTGAGG	58	nr
Rw537	AAACATGCGGTCAAGTACCC		239

¹temperatura di *annealing*; nr = sequenziamento non riuscito

Tabella 3. Sequenze di adattatori e *primer* utilizzati per il completamento delle sequenza genomica di *PIMT* in girasole mediante *PCR-walking*.

Adattatore/	Sequenza (5' - 3')
Adattatori	
ADAPL	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGGAGGT
ADSPS	ACCTCCCC-NH ₂
6.1.1.1.1 PRIMER	
6.1.1.1.2 Su	
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC
5' PCR-walking¹	
Rw537	AAACATGCGGTCAAGTACCC
Rw217	ATGCATCCCAGGCTGTAAAT
Rw271	CTGCTCCACCATGGCTTTAT
3' PCR-walking²	
Fw1118	CACCAGAAATCCCGAAACCA
FW1161	GGGGAGGTTGGTGATTCCAG

¹*primer* ancorati nella regione nota di *PIMT* utilizzati nelle reazioni di 5' *PCR-walking*

²*primer* ancorati nella regione nota di *PIMT* utilizzati nelle reazioni di 3' *PCR-walking*

Tabella 4. Lista di *primer* utilizzati per isolare i tre frammenti che formano l'intera sequenza genomica di *PIMT* analizzata nelle 16 linee di girasole, relative sequenze e lunghezza degli ampliconi prodotti.

Frammento	Primer	Sequenza (5' - 3')	Amplicone (pb)
1	Fw107 Rw655	TGTCGGTGGCTGACATTA CCTCTAAGGCGCACAAACAG	552
2	Fw115 Rw940	AGACAGTCCCATGCCGATA GTAACGGACCAGCTGCACTT	779
2 ¹	Fw162 Rw940	TCCCATGCCGATAGGTTTTA GTAACGGACCAGCTGCACTT	773
3	Fw518 Rw641	GGGTACTTGACCGCATGTTT TAAACTCGTCAACCCGAAGC	639

¹coppia di *primer* utilizzati per amplificare il secondo frammento nelle linee RHA374, RHA464, INRA-293

Tabella 5. *Primer* utilizzati nell'analisi di espressione *real time*, relative sequenze e lunghezza degli ampliconi prodotti.

Target	Primer	Sequenza (5' - 3')	Amplicone (pb)
Actina	Δ ctFw ActRw	AACAGGAATGGTGAAGGCAG AGAATACCTCTCTTTGATTGTGCTT	156
EF1	EFFw EFRw	TGATCTGCTGCTGTAACAAGATG ACCAGAGATTGGCACGAATG	143
S19	S19Fw S19Rw	CGCAAAGGAATGGTAGTGC CGATGTAATCTTCCTTCCACCC	132
PIMT	PIMTFw PIMTRw	TTGCATGTTGGTGACGGC TGTTCCCAACTGGAATCACC	145

Tabella 6. Posizione, frequenza e varianti dei siti polimorfici per aplotipo. a) SNP; b) INDEL.

a)

Aplotipo	Frequenza	Posizione SNP (consensus)					
		Esone II		Introne II		Esone IV	
		201	292	384	396	935	1022
1	0,13	G	G	T	T	A	G
2	0,81	A	C	G	G	G	G
3	0,06	A	C	T	T	A	A
	Tipo	sin.	non-sin.	-	-	non-sin.	non-sin.

b)

Aplotipo	Frequenza	Posizione INDEL (consensus)			
		Introne II			
		454	495	512	593
1	0,13	CGTGCGCCT	AGG	-	TTTTGCCT
2	0,81	CGTGCGCCT	-	G	TTTTGCGT
3	0,06	-	AGG	-	-

Sin = mutazioni sinonime

Non-sin = mutazioni non sinonime

Tabella 7. Misure di diversità genetica relative all'intera sequenza o a singole porzioni del gene *P1MT* in girasole.

Porzione di sequenza	Nucleotidi (n.)	Tipo di polimorfismo	S	H	Hd	k	π	θ	Test di Tajima (D)
Tutta	1441	SNP	6	3	0,342	1,567	0,0011	0,0013	n.s.
		INDEL	4	3	0,342	0,900	0,0006		
CDS	693	SNP	4	3	0,342	0,917	0,0013	0,0017	n.s.
		INDEL	0	0	0,000	0,000	-		
Introni	687	SNP	2	2	0,325	0,650	0,0010	0,0009	n.s.
		INDEL	4	3	0,342	0,900	0,0013		
3'-UTR	66	SNP	0	0	0,000	0,000	0,0000	0,0000	n.s.
		INDEL	0	0	0,000	0,000	-		

S = Numero totale dei siti polimorfici; H = Numero di aplotipi; Hd = Diversità aplotipica; π = Diversità nucleotidica; θ = Numero di siti segreganti

Tabella 8. Quadrati medi dell'analisi della varianza e corrispondenti livelli di significatività per germinabilità e T₅₀.

Cause di variazione	Gradi di libertà	Germin. max		T ₅₀	
		QM	P	QM	P
Linee	15	0,220	***	2207,6	***
Aging	1	0,145	***	1961,9	***
Priming	1	0,021	ns	6904,1	***
Linee x Aging	15	0,010	ns	887,5	***
Linee x Priming	15	0,015	**	574,5	***
Aging x Priming	1	0,033	*	284,4	**
Linee x Aging x Priming	15	0,012	*	315,0	***
Errore sperimentale	64	0,006		36,1	

*, **, *** significativo per $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ rispettivamente.

Tabella 9. Germinabilità finale nelle 16 linee in relazione ai trattamenti di *aging* e di *priming*.

Linee	Germinabilità (%) ¹			
	noAA noPr	AA noPr	noAA Pr	AA Pr
CRA-16UPR	71 d	79 ce	72 e	53 d
CRA-216/3-4	78 cd	66 e	95 ad	82 bc
HA89	90 ad	80 ce	89 ae	90 ac
HA89*	87 bd	86 be	93 ad	77 cd
INRA-107	73 d	74 de	76 de	77 cd
INRA-109	79 bd	68 e	80 ce	54 d
INRA-293	88 ad	78 ce	90 ae	83 bc
INRA-295	96 ab	93 ac	89 ae	97 ab
INRA-306	90 ad	97 ab	96 ac	91 ac
RHA265	70 d	76 ce	91 ae	75 cd
RHA294	94 ac	91 ad	94 ad	88 bc
RHA374	77 cd	73 de	86 be	82 bc
RHA419	99 a	98 ab	99 a	94 ab
RHA426	99 a	99 a	99 a	99 a
RHA464	99 a	97 ab	98 ab	97 ab
UNIPI-GB2112	69 d	69 e	82 ce	73 cd
	85	83	89	82

¹Determinazione effettuata su 100 semi. All'interno di ogni colonna le medie contrassegnate dalla medesima lettera, incluse le lettere intermedie, non sono tra loro significativamente diverse per P 0,05 (test di Tuckey)

Tabella 10. T₅₀ nelle 16 linee in relazione ai trattamenti di *aging* e di *priming*.

Linee	T ₅₀ (h) ¹			
	noAA noPr	AA noPr	noAA Pr	AA Pr
CRA-16UPR	82,3 a	82,3 ab	76,5 a	127,6 a
CRA-216/3-4	44,5 ce	43,1 ef	31,1 bf	23,5 de
HA89	58,5 be	61,3 bf	37,8 bd	36,0 ce
HA89*	64,8 ad	65,7 ad	43,4 bc	42,4 cd
INRA-107	65,5 ac	65,7 ad	89,4 a	72,9 b
INRA-109	65,0 ad	80,9 ab	75,8 a	72,8 b
INRA-293	43,2 e	79,0 ac	15,5 ef	41,0 cd
INRA-295	43,4 de	40,8 f	31,0 bf	14,5 e
INRA-306	43,7 de	83,3 a	16,5 df	128,5 a
RHA265	64,4 ae	63,6 ae	40,2 bc	41,3 cd
RHA294	69,3 ab	63,4 ae	50,8 b	54,3 bc
RHA374	44,2 ce	56,0 df	30,6 bf	36,4 ce
RHA419	62,4 ae	51,4 df	21,1 cf	35,4 ce
RHA426	63,8 ae	64,4 ae	30,5 bf	27,2 de
RHA464	52,7 be	43,1 ef	14,9 f	25,2 de
UNUPI-GB2112	56,5 be	57,9 cf	36,5 be	35,7 ce
Medie	57,8	62,6	40,0	51,0

¹All'interno di ogni colonna le medie contrassegnate dalla medesima lettera, incluse le lettere intermedie, non sono tra loro significativamente diverse per *P* 0,05 (test di Tuckey)

Tabella 11. Effetti del solo *aging*, solo *priming*, e del *priming* dopo *aging* su germinabilità finale e T₅₀ nelle 16 linee analizzate.

Linee	Aging ¹		Priming ¹		Priming dopo Aging ¹	
	Germin. (%)	T ₅₀ (h)	Germin. (%)	T ₅₀ (h)	Germin. (%)	T ₅₀ (h)
CRA-16UPR	8,0a	0,0b	1,0ab	-5,8ac	-26,0b	45,3a
CRA-216/3-4	-12,0a	-1,4b	17,0ab	-13,4bd	16,0a	-19,7bc
HA89	-10,0a	2,8b	-1,0ab	-20,7cd	10,0a	-25,2c
HA89*	-1,0a	0,9b	6,0ab	-21,4cd	-9,0ab	-23,3c
INRA-107	1,0a	0,2b	3,0ab	23,9a	3,0ab	7,2b
INRA-109	-11,0a	15,9ab	1,0ab	10,8ab	-14,0ab	-8,2bc
INRA-293	-10,0a	35,8a	2,0ab	-27,7cd	5,0ab	-38,0c
INRA-295	-3,0a	-2,6b	-7,0b	-12,4bd	4,0ab	-26,3c
INRA-306	7,0a	39,6a	6,0ab	-27,2cd	-6,0ab	45,1a
RHA265	6,0a	-0,9b	21,0a	-24,2cd	-1,0ab	-22,3bc
RHA294	-3,0a	-5,8b	0,0ab	-18,4bd	-3,0ab	-9,1bc
RHA374	-4,0a	11,8ab	9,0ab	-13,7bd	9,0ab	-19,6bc
RHA419	-1,0a	-11,1b	0,0ab	-41,4d	-4,0ab	-16,0bc
RHA426	0,0a	0,6b	0,0ab	-33,4cd	0,0ab	-37,2c
RHA464	-2,0a	-9,6b	-1,0ab	-37,8d	0,0ab	-17,9bc
UNIPI-GB2112	0,0a	1,4b	13,0ab	-20,0cd	4,0ab	-22,2bc
Medie	-2,2	4,8	4,4	-17,7	-0,8	-11,7

¹All'interno di ogni colonna le differenze contrassegnate dalla medesima lettera, incluse le lettere intermedie, non sono tra loro significativamente diverse per $P < 0,05$ (test di Tuckey)

Tabella 12. Quadrati medi dell'analisi della varianza e corrispondenti livelli di significatività relativi all'espressione genica, espressa in *fold change* rispetto al calibratore (HA89, controllo).

Cause di variazione	Gradi di libertà	QM	P
Linee	15	22,59	***
Aging	1	76,86	***
Priming	1	10,20	***
Linee x Aging	15	6,34	***
Linee x Priming	15	9,42	***
Aging x Priming	1	31,40	***
Linee x Aging x Priming	15	5,48	***
Errore sperimentale	64	0,82	

*, **, *** significativo per P 0,05, P 0,01 e P 0,001 rispettivamente

Tabella 13. *Fold change* nelle 16 linee in relazione ai trattamenti di *aging* e di *priming*.

Linee	<i>Fold change</i> ¹			
	noAA noPr	AA noPr	noAA Pr	AA Pr
CRA-16UPR	7,1 b	3,1 a	7,7 a	8,3 a
CRA-216/3-4	2,0 ef	1,3 a	1,5 d	1,6 bc
HA89	1,0 f	1,2 a	0,2 d	0,4 c
HA89*	0,9 f	1,3 a	0,2 d	0,2 c
INRA-107	2,4 df	1,3 a	2,5 bd	2,2 bc
INRA-109	1,1 ef	0,9 a	1,8 cd	1,4 bc
INRA-293	2,2 ef	1,4 a	0,7 d	1,1 bc
INRA-295	6,6 b	1,1 a	4,8 ac	3,1 bc
INRA-306	2,5 df	1,9 a	1,5 d	1,7 bc
RHA265	7,2 b	1,9 a	6,4 a	3,8 b
RHA294	6,3 bc	1,8 a	2,0 cd	2,0 bc
RHA374	4,3 be	3,3 a	5,7 ab	3,7 b
RHA419	5,5 bd	1,6 a	1,1 d	0,9 bc
RHA426	14,1 a	1,9 a	1,3 d	0,9 bc
RHA464	3,1 cf	1,9 a	1,0 d	0,7 bc
UNUPI-GB2112	2,5 df	2,1 a	5,3 ab	2,5 bc
Medie	4,3	1,8	2,7	2,2

¹All'interno di ogni colonna le medie contrassegnate dalla medesima lettera, incluse le lettere intermedie, non sono tra loro significativamente diverse per *P* 0,05 (test di Tuckey)

Tabella 14. Effetti sul *fold change* del solo *aging* e del solo *priming*, calcolati come differenza rispetto al controllo, e del *priming* dopo *aging* rispetto al solo *aging* nelle 16 linee analizzate.

Linee	Aging ¹	Priming ¹	Priming dopo Aging ¹
CRA-16UPR	-3,9be	0,7 ab	5,2 a
CRA-216/3-4	-0,8ce	-0,6 ac	0,3 b
HA89	0,2 e	-0,8 ac	-0,8 b
HA89*	0,4 e	-0,7 ac	-1,1 b
INRA-107	-1,1 be	0,0 ac	0,9 b
INRA-109	-0,2 de	0,7 ab	0,5 b
INRA-293	-0,7 ce	-1,4 ac	-0,4 b
INRA-295	-5,5 b	-1,8 bc	2,1 ab
INRA-306	-0,6 de	-1,0 ac	-0,2 b
RHA265	-5,3 bc	-0,7 ac	2,0 ab
RHA294	-4,4 bd	-4,3 c	0,1 b
RHA374	-1,0 be	1,5 a	0,4 b
RHA419	-3,9 be	-4,3 c	-0,7 b
RHA426	-12,2 a	-12,8 d	-0,9 b
RHA464	-1,3 be	-2,1 bc	-1,1 b
UNIPI-GB2112	-0,4 de	2,8 a	0,4 b
Medie	-2,5	-1,6	0,4

¹All'interno di ogni colonna le differenze contrassegnate dalla medesima lettera, incluse le lettere intermedie, non sono tra loro significativamente diverse per $P < 0,05$ (test di Tuckey)

Tabella 15. Correlazioni tra germinabilità (%), T₅₀ (h) e livello di espressione genica (FC) in relazione ai diversi trattamenti.

		Germinabilità	T50
NoAA noPr	T50	-0,225	
	FC	0,258	0,292
AA noPr	T50	-0,135	
	FC	-0,027	0,143
NoAA Pr	T50	-0,797 ***	
	FC	-0,572 *	0,297
AA Pr	T50	-0,514 *	
	FC	-0,549 *	0,494 *
Tutti i trattamenti	T50	-0,459	
	FC	-0,107	0,252

*, **, *** significativo rispettivamente per P 0,05, P 0,01 e P 0,001

FIGURE

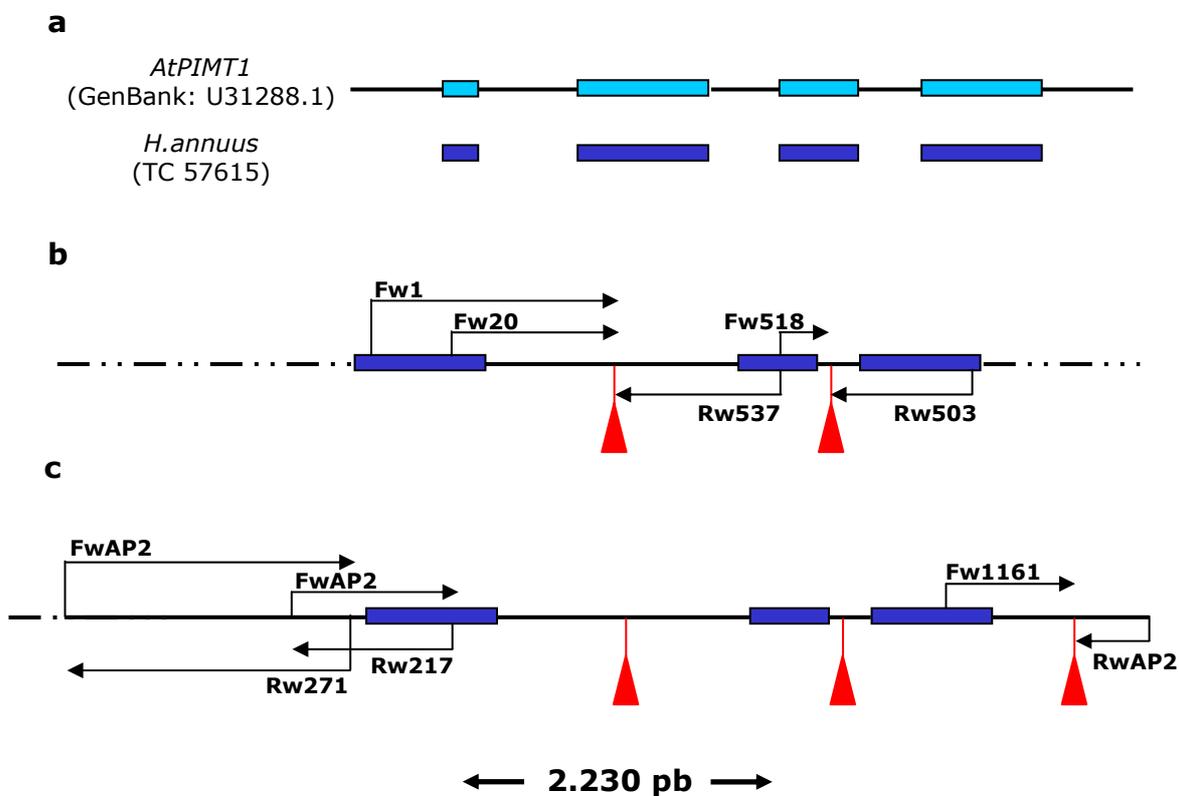


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'isolamento della sequenza genomica del gene *PIMT* in girasole: gli esoni sono indicati dai riquadri, le regioni non codificanti dalle linee che li connettono. a) Allineamento della sequenza genomica (5' - 3') di *PIMT* in *A.thaliana* (*AtPIMT1*) con la sequenza espressa putativa di *PIMT* in girasole (TC: 57615) b) Isolamento della sequenza parziale di *PIMT* in girasole: le frecce indicano le porzioni sequenziate mediante le coppie di primer, costruiti su esoni, indicati in tabella 2. I triangoli (in rosso) identificano le regioni dove sono presenti le ripetizioni mononucleotidiche c) Estensione del frammento mediante *PCR-walking*: le frecce indicano le porzioni sequenziate mediante le coppie di primer indicati in Tabella 3.

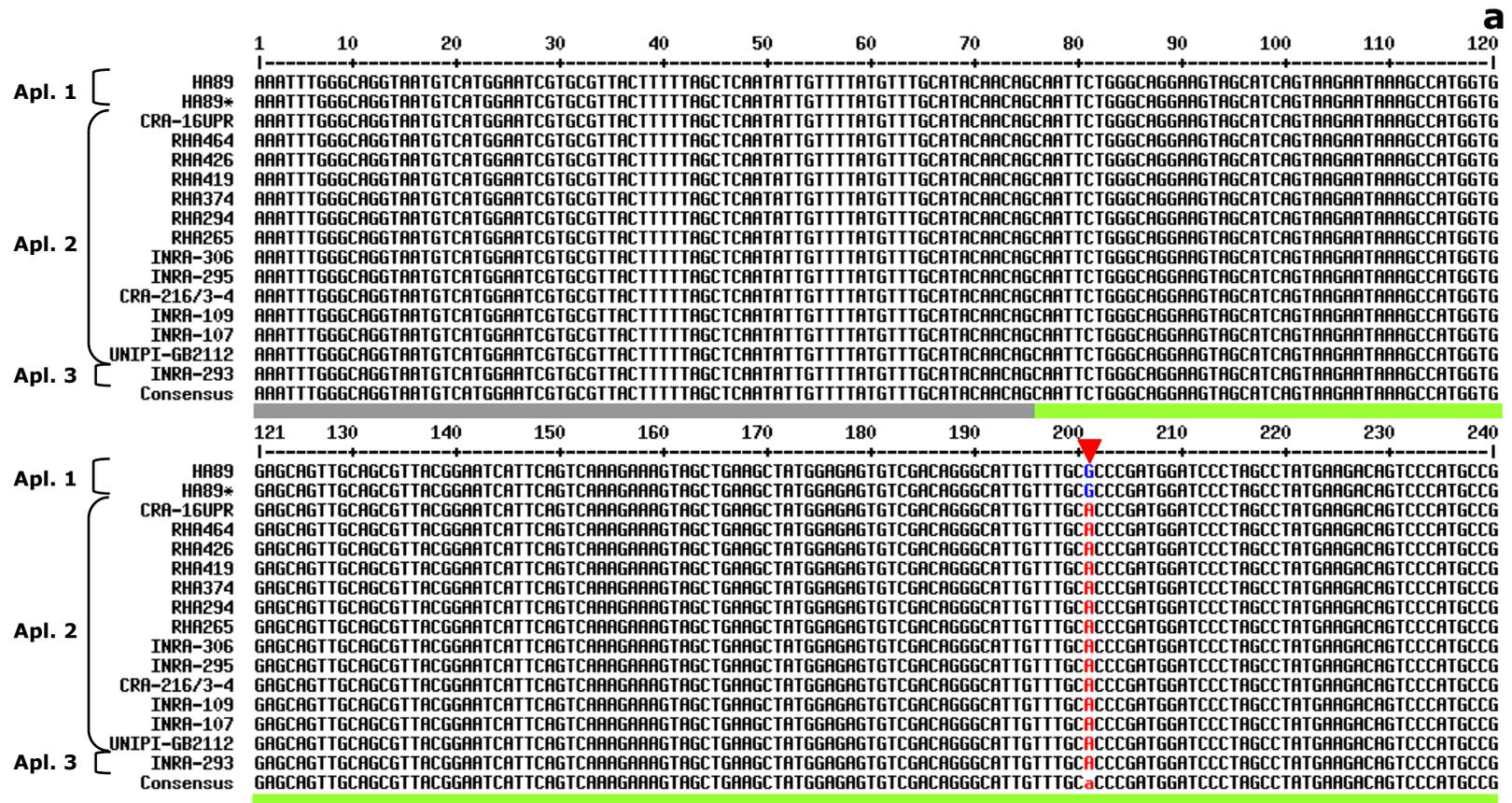


Figura 4. Allineamento attraverso MULTALIN della sequenza genomica di *PIMT* nelle 16 linee di girasole raggruppate per aplotipo (Apl.) In nero: nucleotidi definiti ad alto consenso; in rosso nucleotidi a basso consenso; in blu: nucleotidi neutrali. Le regioni codificanti sono evidenziate da una linea verde, le regioni non codificanti sono in grigio.

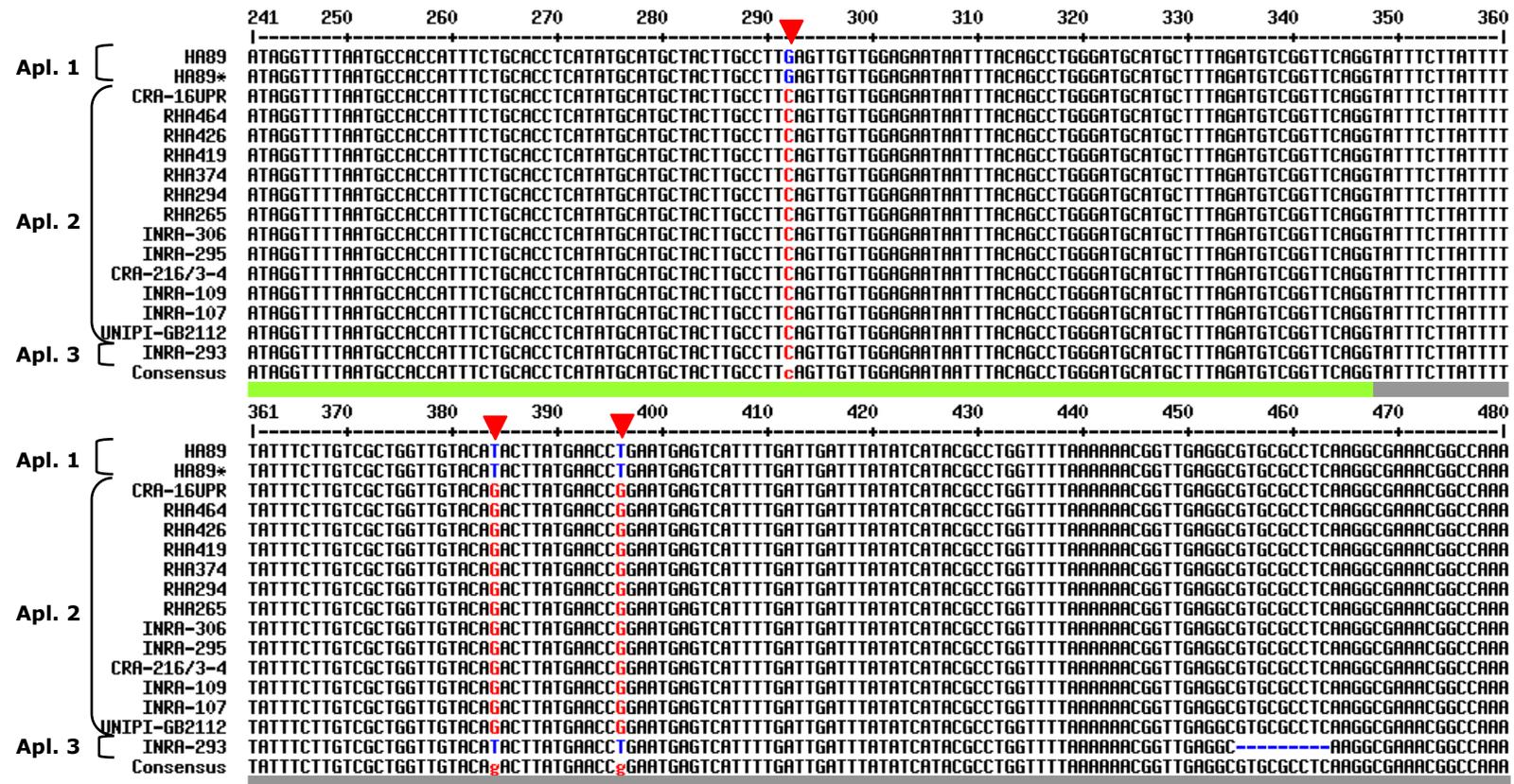


Figura 4. (Continua)

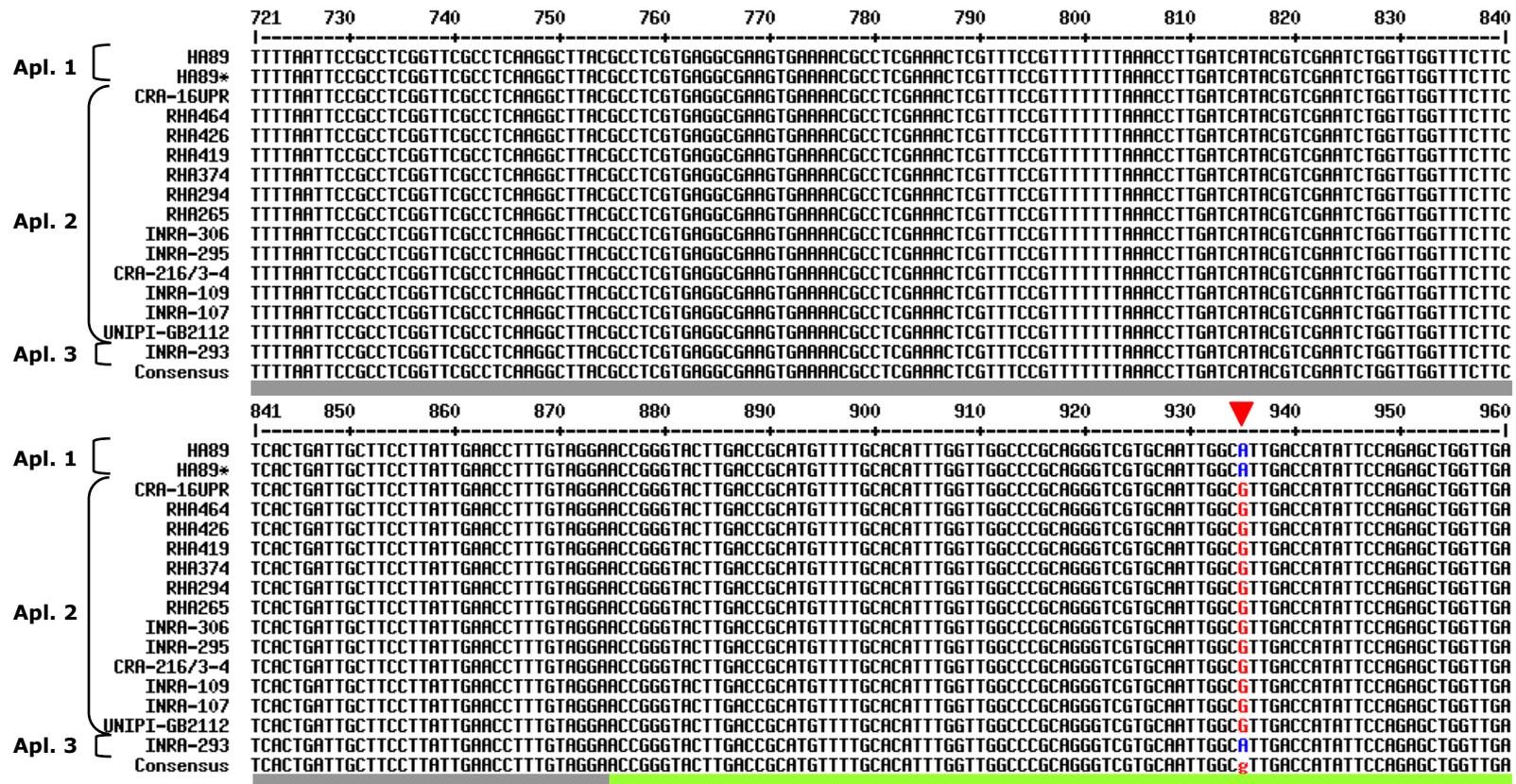


Figura 4. (Continua)

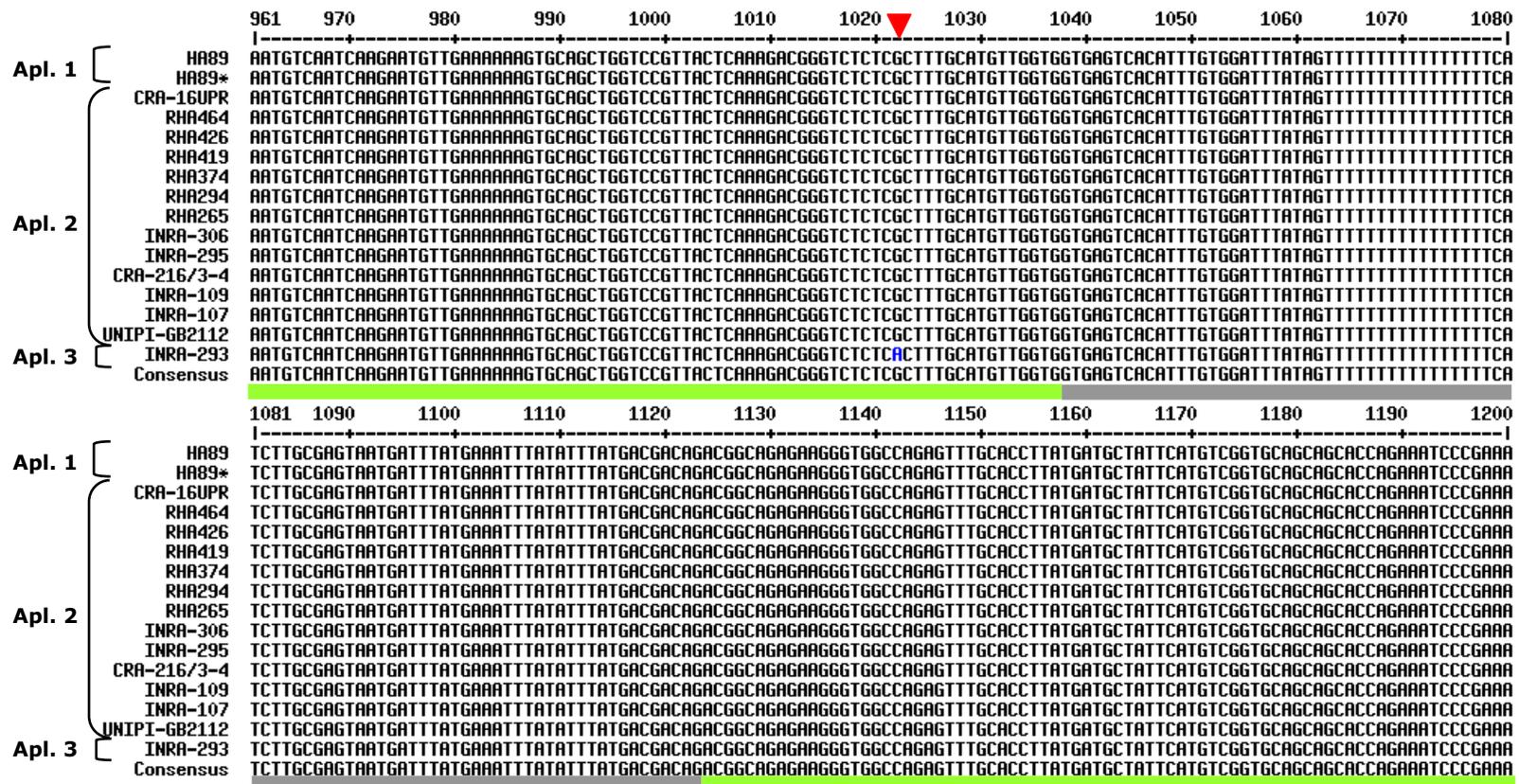


Figura 4. (Continua)

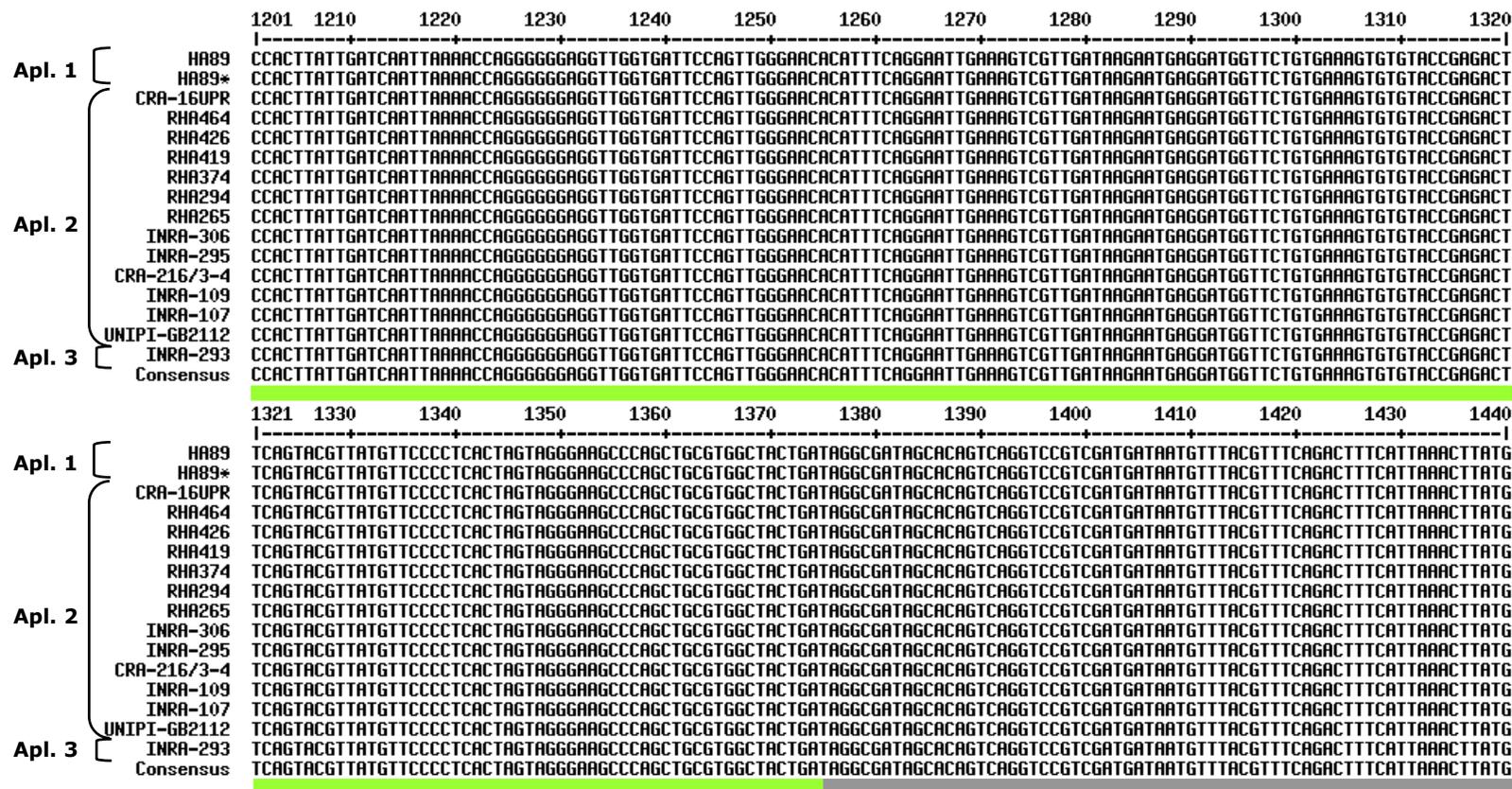


Figura 4. (Continua)

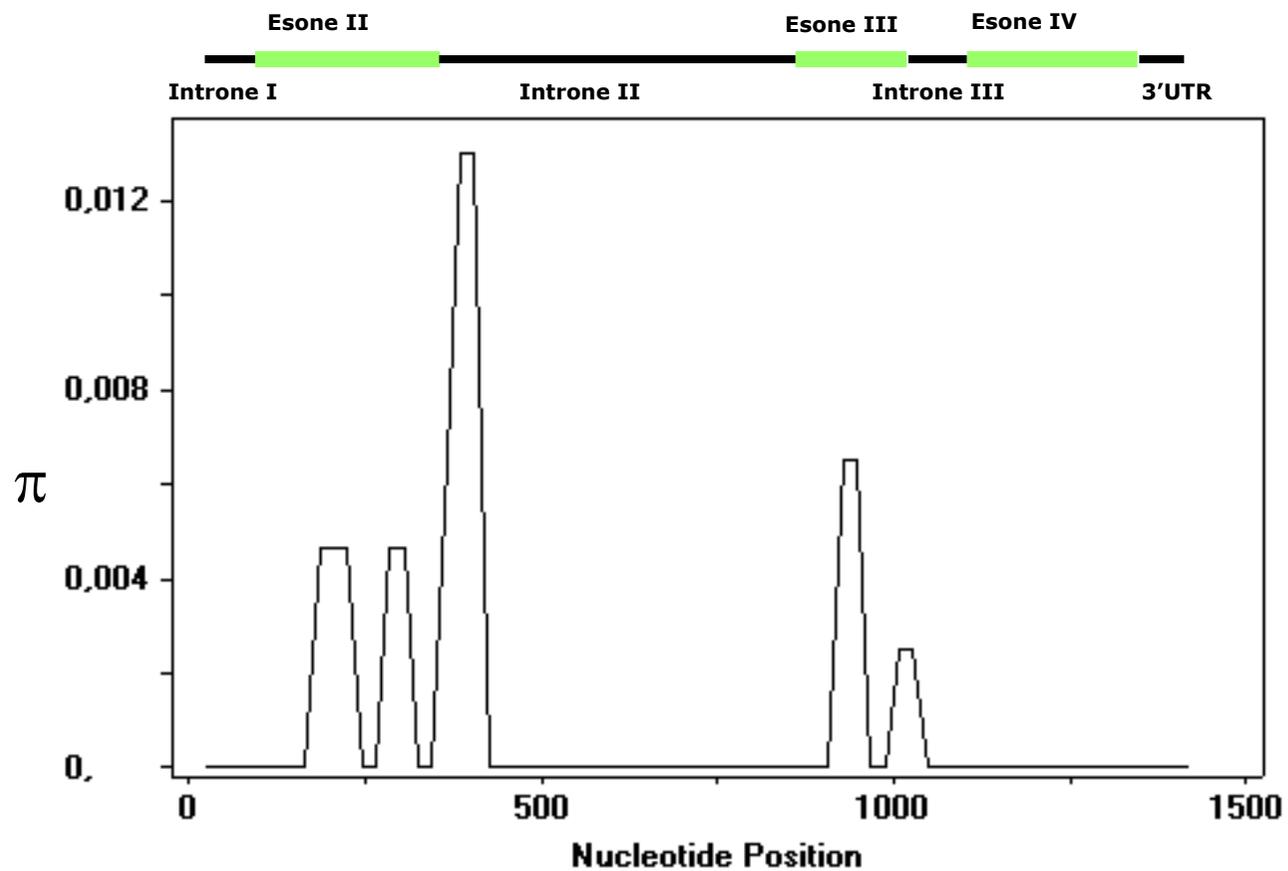


Figura 5. Pattern di variazione della diversità nucleotidica nelle differenti regioni lungo la sequenza del gene *PIMT* nelle 16 accessioni di girasole analizzate.

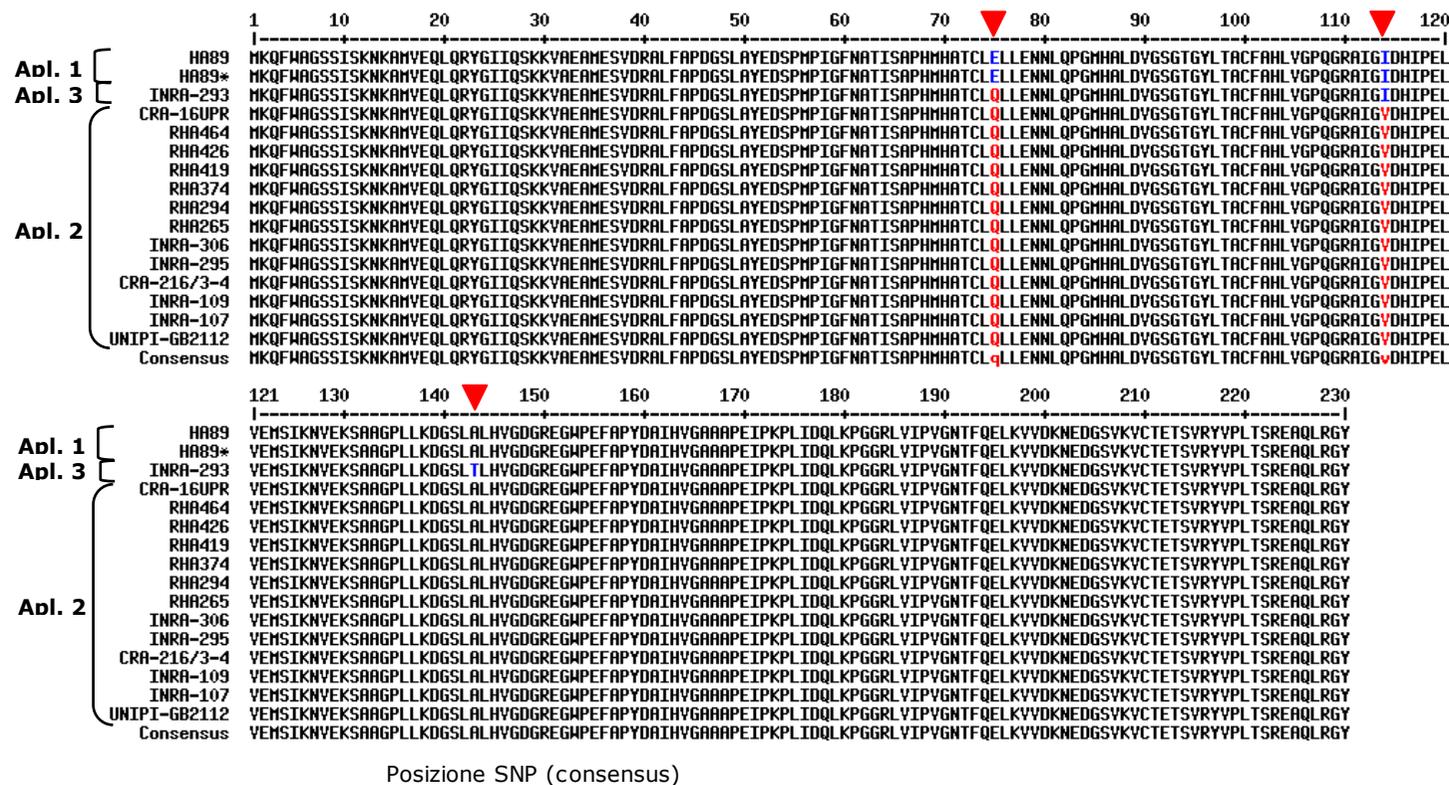


Figura 6. a) Allineamento, mediante MULTALIN, delle sequenze della proteina PIMT dedotta nelle 16 linee di girasole raggruppate per aplotipo (Apl.) In nero: residui ad alto consenso; in rosso residui a basso consenso; in blu: residui neutrali. b) Posizione, frequenza e varianti dei siti polimorfici per aplotipo.

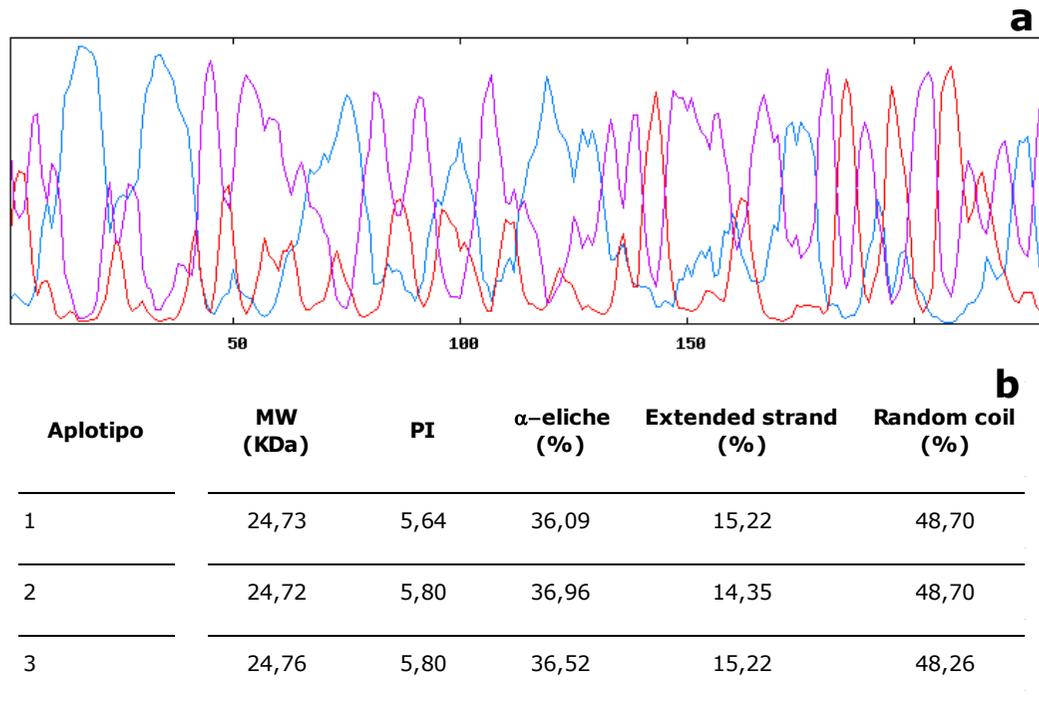


Figura 7. a) Predizione della struttura secondaria della proteina dedotta PIMT (aplotipo 2) ottenuta con il programma HNN. b) Per ciascun aplotipo sono indicate le percentuali delle strutture che formano α -eliche (blu) foglietti β (*extended strand*, in rosso) e *random coil* (rosa), insieme al corrispondente peso molecolare (MW) e punto isoelettrico (pI) calcolati mediante l'ExpASY Protein Server.

Aplotipo 1

10 20 30 40 50 60 70
MKQFWAGSSISKNKAMVEQLQRYGIIQSKKVAEAMESVDRALFAPDGSLAYEDSPMPIGFNATISAPHHH
ccccccccchc hhhhhhhhhhhc hhhc hhhhhhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccchh
ATCLELLENLQPGMHALDVGSGTGYLTACFAHLVGPQGRAIGVDHIPELVEMSIKNVEKSAAGPLLKDG
hhhhhhhhhhcc
SLALHVG DGREGWPEFAPYDAIHVGAAAPEIPKPLIDQLKPGGRLVIPVGNTFQELKVV DKNEDGSVKVC
cc
TETSVRVVPLTSREAQLRGY
cc

Sequence length : 230

Aplotipo 2

10 20 30 40 50 60 70
MKQFWAGSSISKNKAMVEQLQRYGIIQSKKVAEAMESVDRALFAPDGSLAYEDSPMPIGFNATISAPHHH
ccccccccchc hhhhhhhhhhhc hhhc hhhhhhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccchh
ATCLQLENNLQPGMHALDVGSGTGYLTACFAHLVGPQGRAIGVDHIPELVEMSIKNVEKSAAGPLLKDG
hhhhhhhhhhcc
SLALHVG DGREGWPEFAPYDAIHVGAAAPEIPKPLIDQLKPGGRLVIPVGNTFQELKVV DKNEDGSVKVC
cc
TETSVRVVPLTSREAQLRGY
cc

Sequence length : 230

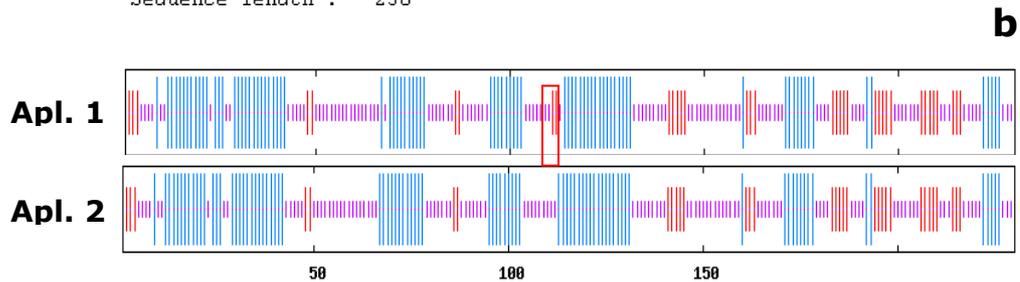


Figura 8. Predizione della struttura secondaria della proteina dedotta di PIMT per l'aplotipo 1 e 2, usando il programma HNN. L'Extended strand associata alla mutazione Val/Iso, nell'aplotipo 1, è evidenziato da un riquadro rosso. a) Residui aminoacidici associati alla struttura predetta: "h" α -eliche, "e" extended strand, e "c" random coil. b) Rappresentazione schematica della struttura predetta: α -eliche (in blu), extended strand (in rosso),

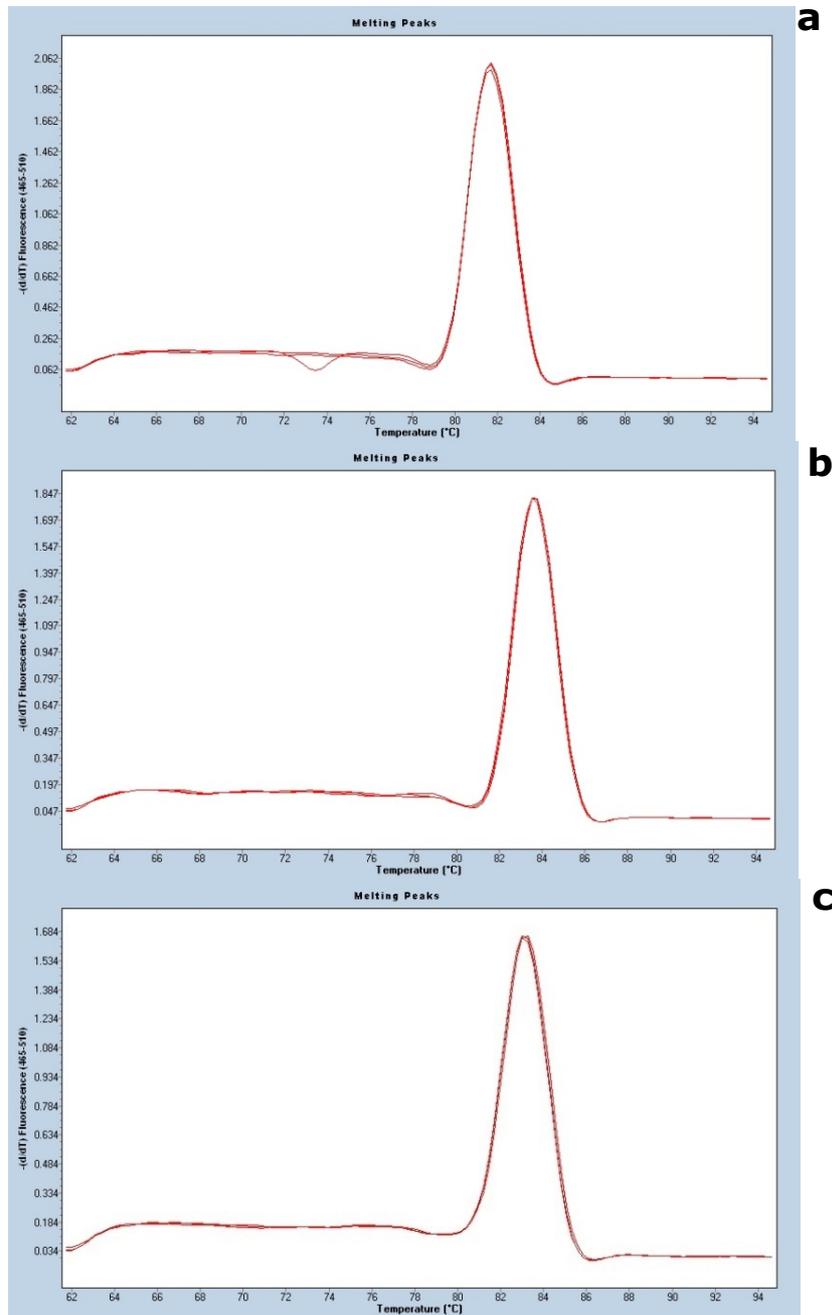


Figura 9. Analisi delle curve di *melting* ottenute per i tre saggi *real time* utilizzati in questo lavoro a) *elongation factor1* b) *S19* c) *P1MT*

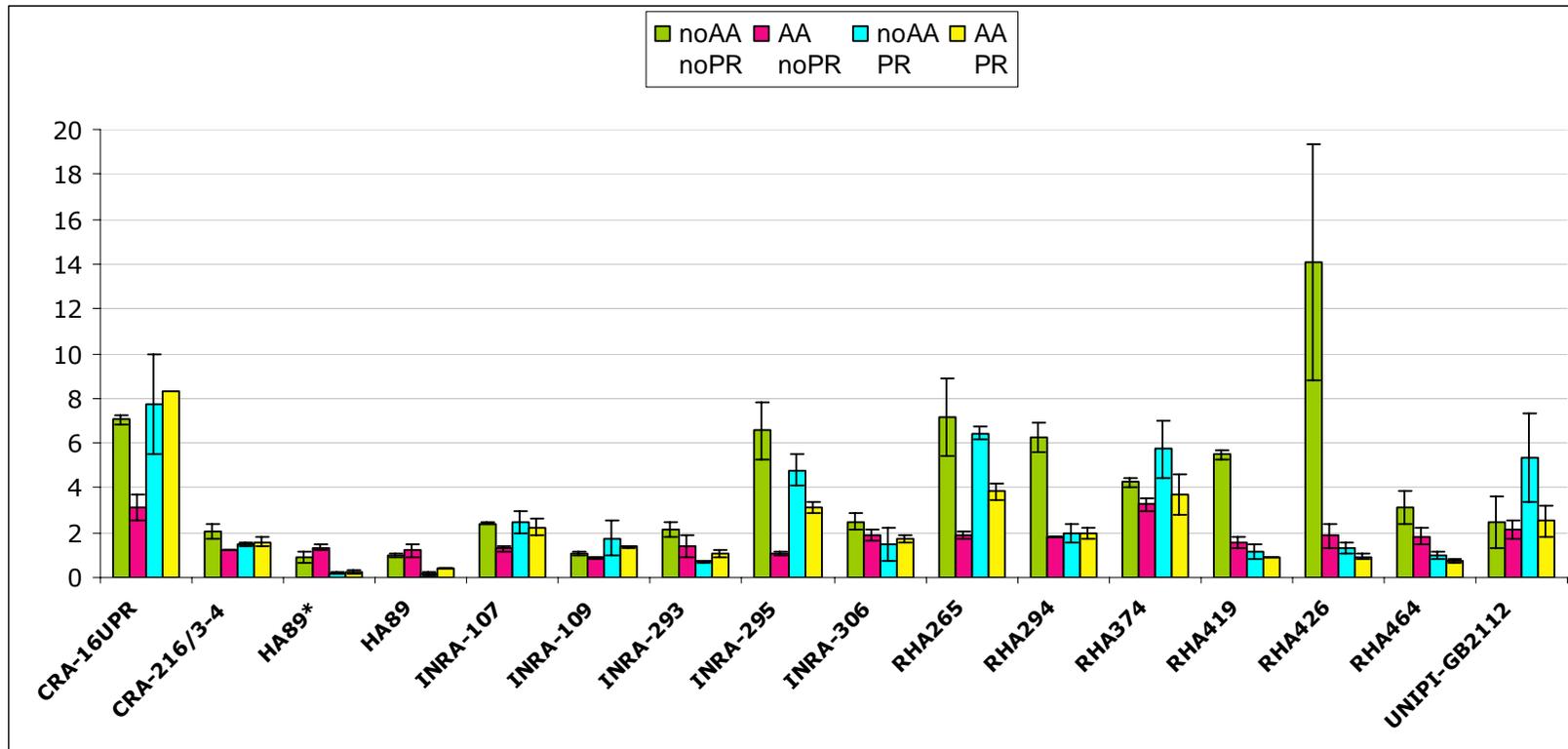


Figura 10. Livelli di espressione del gene *PIMT* relativi alle 16 accessioni di girasole, nelle quattro situazioni sperimentali analizzate: seme quiescente (noAA noPr), dopo *aging* (AA noPr), dopo *priming* e dopo *aging* e *priming* (AA Pr). I valori sono normalizzati rispetto al calibratore HA89 (controllo).

RINGRAZIAMENTI