

## **Abstract**

Durante il secolo scorso sono state individuate alcune mutazioni per il colore della buccia della varietà William che invece di essere giallo arriva a maturazione con diverse tonalità di colore rosso. L'intensità e la tipologia del fenotipo dovuto a questa mutazione mostra una variabilità all'interno dei diversi cloni rossi di questa cultivar: Max Red Bartlett, Rosired e Sensation. Questa mutazione è ereditabile e usando come genitore uno dei sopra-citati mutanti per il rosso sono state prodotte altre cultivar caratterizzate da buccia rossa come Cascade.

Max Red Bartlett presenta una intensa colorazione rossa nelle prime fasi di maturazione per poi striarsi perdendo di lucentezza e non ricoprendo totalmente la superficie del frutto. Max Red Bartlett ha inoltre il problema di regressione del colore. Questa mutazione infatti non è stabile e dopo qualche anno può regredire e presentare il fenotipo di William. Diverso è invece lo sviluppo per esempio di Rosired che durante le prime fasi di accrescimento del frutto è identica a Williams (di colore verde con la parte del frutto rivolta verso il sole leggermente rossastra) per poi virare e mantenere un vivo colore rosso su tutta la superficie del frutto. Questa tesi si è proposta di caratterizzare questa mutazione che coinvolge in qualche modo la via biosintetica per la sintesi del colore. In particolare si è cercato di investigare sui probabili geni della via degli antociani coinvolti e in quale modo vengono espressi durante la maturazione del frutto, inoltre si è cercato di trovare quali specifiche molecole venissero diversamente sintetizzate. Le cultivar utilizzate sono state William e Max Red Bartlett. Di quest'ultima era già disponibile una mappa molecolare, ottenuta sulla popolazione di incrocio di Abate Fetel (gialla) x MRB (rossa)

con AFLP e SSR, quest'ultimi hanno permesso di denominare i diversi linkage group grazie alla sintonia con le altre mappe di pero e di melo.

I semenzali appartenenti a questa popolazione, oltre a dimostrare l'ereditarietà del carattere, erano per il 50% gialli e 50% rossi. Questo ha permesso il mappaggio di questo carattere/mutazione che si è posizionato nel linkage group 4.

Una ricerca in banca dati eseguita in parallelo ha permesso di trovare sequenze di melo dei geni coinvolti nella via biosintetica degli antociani (CHS, CHI, F3H, DFR, ANS e UFGT), sulle quali è stato possibile disegnare primer degenerati che amplificassero su DNA genomico di pero. Le amplificazioni hanno dato frammenti di lunghezza diversa. Infatti nel caso di F3H e DFR l'altissima omologia tra melo e pero ha permesso l'amplificazione quasi totale del gene, negli altri casi invece è stato necessario utilizzare primer sempre più vicini in modo da facilitare l'amplificazione. I frammenti ottenuti sono stati clonati e sequenziati per confermare la specificità degli amplificati.

Non sono stati evidenziati polimorfismi di sequenza in nessuna delle sei sequenze tra William e Max Red Bartlett e nessun polimorfismo con Abate, per questo motivo non è stato possibile mapparli e vedere se qualcuno di questi geni era localizzato nella medesima posizione in cui era stato mappato il "colore/mutazione". Sulle le sequenze ottenute è stato possibile disegnare altri primer, questa volta specifici, sia per analisi d'espressione.

Inizialmente è stato sintetizzato il cDNA dei geni suddetti per retrotrascrizione da RNA estratto sia da bucce sia da foglie appena germogliate (le quali presentano solo in questa fase una colorazione rossastra in MRB ma non in William). Al fine di osservare come varia l'espressione dei geni della via

biosintetica delle antocianine durante la fase di maturazione dei frutti, sono stati fatti 4 campionamenti, il primo a 45gg dalla piena fioritura, poi a 60, 90, 120 giorni. Foglie e bucce sono state prelevate in campo e poste immediatamente in azoto liquido. Dai risultati con Real Time è emerso che vi è una maggiore espressione nelle prime fasi di sviluppo in Max Red Bartlett per poi calare enormemente in giugno. Si potrebbe ipotizzare che ci sia una reazione di feed back da parte della piante considerando che in questa fase il frutto non si accresce. I livelli di espressione poi aumentano verso la fase finale della maturazione del frutto. In agosto, con l'ultimo campionamento vi è una espressione assai maggiore in Max Red Bartlett per quei geni posti a valle della via biosintetica per la sintesi delle antocianine. Questo risultato è confermato anche dal livello di espressione che si riscontra nelle foglie. In cui i geni F3H, LDOX e UFGT hanno un livello di espressione nettamente maggiore in Max Red Bartlett rispetto a William.

Recentemente Takos et al (2006) hanno pubblicato uno studio su un gene regolatore della famiglia Myb e ciò ha permesso di ampliare i nostri studi anche su questo gene. L'altissima omologia di sequenza, anche a livello di introni, non ha permesso di individuare polimorfismi tra le varietà Abate Fetel e Max Red Bartlett, per nessun gene ad eccezione proprio del gene regolatore Myb. I risultati ottenuti in questa tesi dimostrano che in pero l'espressione relativa del gene Myb codificante per una proteina regolatrice mostra una netta sovra-espressione nel primo stadio di maturazione del frutto, in Max Red Bartlett 25 volte maggiore che in William. All'interno della sequenza del gene un polimorfismo prodotto da un microsatellite ha permesso il mappaggio del gene nel linkage group 9 in Max Red Bartlett e in Abate Fetel. Confrontando

questo dato di mappa con quello del carattere morfologico rosso, mappato nel linkage group 4, si deduce che la mutazione non agisce direttamente sulla sequenza di questo gene regolatore, benché sia espresso maggiormente in Max Red Bartlett rispetto a William ma agisca in un altro modo ancora da scoprire. Infine per entrambe le varietà (William e Max Red Bartlett) sono state effettuate analisi fenotipiche in diversi step. Innanzi tutto si è proceduto con una analisi preliminare in HPLC per osservare se vi fossero differenze nella produzione di composti con assorbimento specifica delle antocianine e dei flavonoidi in generale. Si è potuto quindi osservare la presenza di due picchi in Max Red Bartlett ma non in William. La mancanza di standard che coincidessero con i picchi rilevati dallo spettro non ha permesso in questa fase di fare alcuna ipotesi riguardo alla loro natura.

Partendo da questo risultato l'investigazione è proceduta attraverso analisi di spettrometria di massa associate ad una cromatografia liquida identificando con una certa precisione due composti: la cianidina-3-O-glucoside e la quercitina-3-O-glucoside. In particolare la cianidina sembra essere la molecola responsabile della colorazione della buccia nei frutti di pera. Successive analisi sono state fatte sempre con lo spettrometro di massa ma collegato ad un gas cromatografo per verificare se vi fossero delle differenze anche nella produzione di zuccheri e più in generale di molecole volatili. L'assenza di variazioni significative ha dimostrato che la mutazione coinvolge solo il colore della buccia e non le caratteristiche gustative e organolettiche di William che restano inalterate nel mutante.

## Introduzione

### Inquadramento varietale

Il genere *Pyrus* appartiene alla famiglia delle *Rosaceae* e alla sottofamiglia delle *Pomoideae* la quale comprende 22 specie primarie, tutte originarie dell'Europa, dell'Asia e del Nord Africa.

La sottofamiglia delle *Pomoideae* si differenzia dalle altre *Rosaceae* per il numero di base di cromosomi: le *Pomoideae* hanno 17 cromosomi, mentre le altre *Rosaceae* ne hanno da 7 a 9.

E' stato suggerito che le *Pomoideae* possano essere derivate da un'ibridazione interspecifica fra due forme primitive di *Rosaceae* aventi una 8 cromosomi e l'altra 9, seguita da un raddoppiamento cromosomico e da un successivo fenomeno di diploidizzazione secondaria (Bell R. et al. 1996).

La maggior parte delle varietà coltivate sono diploidi ( $2n=34$ ,  $x=17$ ), anche se esistono alcune cultivar poliploidi di *P.communis*.

Il *P. communis* L. è la specie di maggiore interesse commerciale in Europa, America, Africa e Australia. A questa specie appartengono diverse cultivar. Fra le più importanti ricordiamo William, Abate Fetel, Kaiser, Conference, Decana del Comizio, Passa Crassana, Dr. Guyot.

*P. pyrifolia* (conosciuto anche con il nome giapponese di Nashi), è invece la specie maggiormente coltivata in Cina e Giappone, dove è apprezzato per la sua polpa croccante, dolce e poco acida.

La produzione mondiale di pere oggi si aggira intorno alle 12 tonnellate per anno grazie soprattutto all'incremento produttivo della Cina. L'Italia è il principale produttore d'Europa con quasi 900.000 tonnellate annue. L'Emilia

Romagna si colloca in una posizione di rilievo con circa 600.000 tonnellate, pari al 68% della produzione nazionale. Accanto a questa elevata e costante produzione è stata osservata una forte contrazione del numero delle varietà di pero coltivate. Nell'ultimo secolo si è passati da un centinaio ad appena una trentina, di cui solo cinque (Abate Fetél, Williams, Max Red Bartlett, Bosc, Conference, Comice) costituiscono oltre l'80% della produzione.

A livello europeo la cultivar Conference è la più coltivata con quantitativi stabili intorno ai 753.000 tonnellate. In Italia la cultivar Abate Fetél (31.9%) detiene la prima posizione per entità di produzione. Questo dato indica l'attuale solidità della cultivar ma al tempo stesso pone anche il problema, nel lungo periodo, di una temibile sovrapproduzione e quindi di uno squilibrio mercantile.

### **Miglioramento genetico del pero**

I principali obiettivi del miglioramento genetico del pero sono indirizzati all'ottenimento di cultivar che rispondano a determinate caratteristiche sia pomologiche sia agronomiche sia commerciali in modo da sfruttare al massimo le condizioni pedoclimatiche che caratterizzano l'areale di coltivazione e nel contempo di garantire un prodotto che incontri i gusti del consumatore.

I punti sui quali si sono concentrati i più recenti programmi di miglioramento genetico riguardano:

- **Resistenze a stress biotici** in particolare al colpo di fuoco batterico, alla psilla, agente del fitoplasma che causa la moria del pero e alla

ticchiolatura. Cultivar resistenti si sono ottenute principalmente attraverso incroci intraspecifici con specie orientali (*P.pyrifolia* e *P.ussuriensis*) in cui è stato possibile identificare geni di resistenza; tuttavia le cultivar in cui è stato ottenuto un buon livello di resistenza non hanno generalmente ottime caratteristiche produttive e qualitative del frutto.

- **Resistenze a stress abiotici** principalmente al freddo invernale in modo da ampliare l'areale di coltivazione del pero anche nelle regioni del nord Europa e di adattamento alle diverse condizioni pedoclimatiche; alcuni di questi scopi sono stati ottenuti utilizzando portinnesti resistenti o in grado di adattarsi alle più diverse condizioni del suolo.
- **Ampliamento del calendario di maturazione** soprattutto a favore di cultivar precocissime e precoci per la produzione di frutti da destinare al consumo fresco adatti all'esportazione; il metodo di miglioramento adottato ha riguardato per lo più incroci interspecifici e intravarietali in modo da raggiungere anche buone caratteristiche qualitative del frutto.
- **Precoce entrata in fruttificazione** importante obiettivo soprattutto per il pero caratterizzato, come d'altra parte la maggior parte delle arboree da frutto, da una fase giovanile molto prolungata.
- **Modificazione dell'habitus vegetativo** e di fruttificazione; cultivar ad *habitus* compatto rispondenti alle esigenze moderne di impianti di coltivazione ad elevata densità sono state ottenute attraverso l'utilizzo di portinnesti nanizzanti, la mutagenesi (Predieri 1997), l'incrocio con varietà nane (Rivalta e Drad 1998) e attraverso il trasferimento mediato

dall'*Agrobacterium* di geni che alterano il metabolismo ormonale della pianta influenzando quindi sull'habitus vegetativo (Negri 1998).

- **Autofertilità** e ricerca di cultivar intercompatibili obiettivi attuati soprattutto attraverso incroci tra *P. communis* e *P. pyrifolia* per trasferire il carattere di autocompatibilità.
- **Miglioramento qualitativo del frutto** in particolare per caratteri quali la pezzatura, la forma, il colore, la qualità della polpa (per i quali sono già stati raggiunti elevati standard qualitativi), resistenza alle manipolazioni e al trasporto, durata di conservazione frigorifera. Di particolare interesse risultano le cultivar con pere rosse caratterizzate appunto da un diffuso colore rosso della buccia originate per mutazione gemmaria spontanea di cultivar preesistenti (da mutazione di William si è originata la cultivar Max Red Bartlett); tuttavia poichè si tratta di una mutazione instabile che può revertire si è cercato attraverso ibridazione di cultivar rosse con cultivar verdi/gialle e tra cultivar rosse di ottenere varietà con il carattere del colore stabile.

Occorre quindi pensare ad un recupero della variabilità genetico-qualitativa delle pere per disporre di potenziali alternative all'attuale assortimento varietale. In particolare di selezionare nuovi genotipi con caratteristiche vegeto-produttive e qualitative più interessanti e in grado di diversificare la produzione allargando il calendario di raccolta, che è troppo concentrato sulle varietà autunnali (Musacchi et al 2006). Si cerca inoltre di diversificare la tipologia del frutto, con diverse opzioni per forma, sapore e colore.

### **Mutazione per il colore rosso nella varietà William**

All'interno del William rappresenta il 20% della produzione nazionale. L'Emilia Romagna è la regione più produttiva (70%) mentre il Veneto rappresenta il 10%. Il frutto è medio, cidoniforme, la buccia è liscia, giallastra, soffusa di rosso all'insolazione, la polpa è biancastra, molto succosa, dolce-acidula.

Durante il secolo scorso sono state individuate alcune mutazioni per il colore della buccia di questa cultivar che invece di essere giallo arriva a maturazione con diverse tonalità di colore rosso a seconda del tipo di mutazione e quindi a seconda della varietà. Tra queste la più famosa è Max Red Bartlett, altre sono Rosired e Sensation. Inoltre, usando come genitore uno dei sopra-citati mutanti per il rosso sono state selezionate altre cultivar caratterizzate da buccia rossa come Cascade.

Max Red Bartlett presenta una intensa colorazione rossa nelle prime fasi di maturazione per poi striarsi perdendo di lucentezza e non ricoprendo totalmente la superficie del frutto. Max Red Bartlett presenta inoltre un problema di regressione del colore. Questa mutazione infatti non è stabile e dopo qualche anno può regredire e presentare il fenotipo di William. Diverso è invece lo sviluppo del colore di Rosired; durante le prime fasi di accrescimento del frutto è identica a Williams (di colore verde con la parte del frutto rivolta verso il sole leggermente rossastra), per poi virare e mantenere un vivo colore rosso su tutta la superficie del frutto. Se la mutazione coinvolge in qualche modo la via biosintetica per la sintesi di pigmenti responsabili del colore dei frutti e in quale modo agisca su di essa, non è al momento noto. Si possono fare solo delle ipotesi sulla base di omologie con altre specie e sulle

quali sono state fatti studi molto approfonditi, come ad esempio la presenza di un trasposone (riscontrato nella vite, Kobayashi et al. 2004) che potrebbe essersi inserito in sequenze genomiche funzionali (Es: geni, promotori etc.) bloccando o attivando la sintesi dei pigmenti responsabili del colore della buccia.

### **Marcatori molecolari e mappe genetiche**

Negli ultimi decenni la crescente domanda di prodotti da parte delle aziende agrarie e dei consumatori ha spinto breeders e genetisti ad incentrare la loro attenzione sulla ricerca di nuove tecniche che possano essere utilizzate per il miglioramento genetico delle piante coltivate. L'introduzione dei marcatori molecolari nei programmi di selezione ha permesso di ovviare a molti dei problemi tipici di questo processo (tempi lunghi, difficoltà nella rilevazione del carattere, interazione fra genotipo e ambiente, difficoltà a selezionare per caratteri quantitativi).

I marcatori molecolari sono frammenti polimorfici di DNA, ossia frammenti di DNA in cui sono presenti delle variazioni di sequenza.

Rispetto ad altri tipi di marcatori offrono numerosi vantaggi: sono ubiquitari e facilmente reperibili nel genoma, sono presenti in genotipi agronomicamente validi, non sono influenzati dall'ambiente e dallo stadio di sviluppo della pianta, inoltre avendo un'eredità mendeliana semplice sono ideali per studi genetici.

Le applicazioni dei marcatori molecolari sono molteplici; fra queste ricordiamo:

- realizzazione di mappe genetiche
- mappaggio di singoli geni

- identificazione di QTL
- studi di filogenesi
- selezione assistita (MAS)
- identificazione varietale (fingerprinting)

Ciascuna classe di marcatori molecolari ha delle peculiarità che la rende più adatta ad alcune applicazioni rispetto ad altre. Le caratteristiche che si devono considerare nella scelta di un marcatore sono:

- il numero di polimorfismi (numero di loci identificati per singola analisi)
- il grado di polimorfismo (numero di alleli identificabili per locus)
- l'allelismo (presenza o assenza di dominanza)
- la trasferibilità tra incroci della stessa specie e in popolazioni appartenenti a specie diverse

Bisogna inoltre valutare i costi delle analisi per produrre e utilizzare il marcatore, la quantità e qualità del DNA richiesto per le analisi, la possibilità di automatizzarle, la riproducibilità.

Di notevole interesse per il miglioramento genetico è la formazione di mappe molecolari le quali permettono la localizzazione di resistenze e geni candidati per specifiche funzioni di interesse agronomico.

Il melo e il pero appartengono entrambi alla famiglia delle Rosaceae e alla subfamiglia delle Pomoideae. SSRs di melo sono stati utilizzati per la caratterizzazione di 36 accessioni di pero che includono 19 peri giapponesi (*P. pyrifolia*), 7 cinesi (*P. bretschneideri* e *P. ussuriensis*), 5 europei (*P. communis*), 3 selvatici (*P. calleryana*) e 2 ibridi derivati dall'incrocio *P.*

*pyrifolia* x *P. communis* (Yamamoto et al. 2001). Tutti i microsatelliti testati hanno prodotto frammenti discreti di amplificazione in tutte le accessioni di pero.

Il successo delle amplificazioni e del polimorfismo dei primers disegnati in *Malus* su *Pyrus* (81%) dimostra l'elevato livello di omologia tra le sequenze fiancheggianti i microsatelliti e della trasferibilità tra i due generi (Yamamoto et al. 2001). Nelle analisi di segregazione ed ereditabilità degli SSRs alcuni mostrano la segregazione attesa indicando che i frammenti esaminati derivano dallo stesso locus il che conferma l'origine comune delle due specie; questa stretta correlazione genetica è supportata anche dal fatto che presentano lo stesso numero di cromosomi ( $2n=34$ ) e dalla presenza di ibridi intergenerici naturali tra le due specie anche se ci sono chiare differenze morfologiche sia nei tessuti vegetativi sia in quelli riproduttivi.

Oggi per fortuna per le analisi molecolari del pero è possibile utilizzare una valida collezione di 140 primer microsatellite disegnati in melo (Liebhard et al., 2002) implementata da un ulteriore centinaio di microsatelliti sviluppati dal progetto europeo HiDRAS (Silferberg-Dilworth et al., 2006). Queste nuove opportunità permettono di superare alcune difficoltà che erano state riscontrate nei primi approcci di mappaggio in pero dovute al fatto che comunque diversi microsatelliti di melo non identificavano loci polimorfici se trasferiti tanto che era stata utilizzata anche la tecnica MFLP (Microsatellite-anchored fragment length polymorphism). Questa tecnica, che consiste in una variante della tecnica AFLP in cui un primer AFLP è sostituito con un primer "ancorato" ad una sequenza microsatellite, aveva identificato nuovi marcatori

co-dominanti in grado di saturare una mappa e di denominare e orientare alcuni gruppi di associazione (Dondini et al., 2004).

Per verificare la sintenia esistente tra melo e pero è stato fatto l'allineamento tra le mappe delle due specie (Pierantoni et al. 2004): più di 100 SSRs di melo sono stati trasferiti in 2 popolazioni F1 di pero europeo. Un totale di 41 SSRs sono stati posizionati su una mappa di associazione nell'incrocio 'Passa Crassana' x 'Harrow Sweet' e 31 nell'incrocio 'Abate Fetel' x 'Max Red Bartlett'. Successivamente si è proceduto all'allineamento delle 4 mappe di associazione di pero con due mappe di melo ('Fiesta' x 'Discovery'; Liebhard et al., 2002) attraverso l'analisi delle segregazioni degli stessi marcatori microsatellite. Si è visto che esiste una significativa conservazione dei loci tra melo e pero; anche le dimensioni degli alleli sono simili nei due generi. I loci SSRs che mostrano la stessa posizione e la stessa distanza nelle mappe di melo e pero indicano chiaramente la presenza di regioni altamente conservate nei genomi. Alcuni microsatelliti sono multilocus solo in melo o in pero suggerendo che molto probabilmente alcune regioni cromosomiche sono state duplicate o traslocate durante l'evoluzione.

Si può concludere dicendo che la similarità fra i genomi del melo e pero non solo conferma la stretta correlazione esistente tra i due generi ma indica anche la possibilità di velocizzare il trasferimento di informazioni da melo a pero dal momento che in melo sono già stati identificati e mappati geni funzionali e QTL.

Recentemente è stata sviluppata una tecnica di mappaggio veloce denominata GSA (Genome Scanning Approach; Patocchi et al 2005) che permette di identificare un'associazione tra un carattere di interesse e alcuni marcatori

SSRs senza costruire la mappa genetica completa dei parentali della popolazione in analisi. Tale approccio consiste nel testare un campione ristretto (bulk) di una popolazione segregante (costituito da un esiguo numero di piante che mostrano il fenotipo estremo) con un numero limitato di marcatori SSR selezionati per essere ben distanziati tra loro in ciascuno dei linkage group della mappa genomica della specie. Per ciascun SSR si analizzano i dati di segregazione degli alleli. Si otterranno dei rapporti 1:1:1:1 nel caso in cui il marcatore non sia associato al gene in esame. Se si trova invece una deviazione da questo rapporto il marcatore SSR testato può essere associato al gene di interesse. Successivamente bisognerà analizzare anche gli altri SSR disponibili che si trovano nelle immediate vicinanze (sopra e sotto) del marcatore putativamente associato. Per stimare meglio infine l'associazione al gene di interesse questi marcatori poi vengono testati sull'intera popolazione.

Perché la tecnica risulti efficace è necessario disporre di una mappa dettagliata della specie analizzata o di specie affini con marcatori SSR altamente polimorfici e ben distanziati in modo da avere una buona copertura di ciascun cromosoma. Questo approccio ha ottenuto i risultati migliori quando applicato a caratteri con segregazione 1:1 come nel caso del colore in una popolazione F1.

Nel pero le mappe molecolari si sono sviluppate negli ultimi anni (Yamamoto et al. 2001; Dondini et al. 2004, Pierantoni et al 2004 e 2006) in particolare sfruttando l'elevata sintonia che con il melo (Pierantoni et al., 2004) che ha permesso il trasferimento di marcatori molecolari specifici. Tale omologia permette anche il traferimento di primer per geni funzionali tra cui i geni

candidati della via biosintetica dei pigmenti antocianici. Grazie al fatto che il carattere colore rosso dell'epicarpo in Max Red Bartlett ha una segregazione di tipo mendeliano dominante tale da renderlo mappabile come marcatore morfologico.

Su mappe genetiche però non sono ancora sature la distanza tra i diversi marcatori può essere di diversi cM in alcune regioni. In questo caso potrebbe diventare molto difficile il sequenziamento del gene responsabile di questa mutazione attraverso tecniche di chromosome walking, come ad esempio è stato fatto per il gene di resistenza a ticchiolatura *Vf* in melo (Belfanti et al. 2004). Sarebbe infatti necessario il posizionamento di due specifici marcatori molecolari a monte e a valle del gene di interesse in un intervallo di almeno 1cM, condizione che in però, al momento, potrebbe non essere verificata.

### **Metaboliti secondari: la teoria della co-evoluzione**

Lo sviluppo della biochimica nel corso del XX secolo ha consentito la scoperta e lo studio di prodotti naturali (aminoacidi, acidi grassi, nucleotidi, etc.) ai quali è stato possibile l'attribuzione di uno specifico ruolo nella vita e nello sviluppo degli organismi viventi. Gran parte di questi prodotti sono presenti in forme spesso molto simili e derivano da processi di biosintesi a volte identici in molti organismi (sia animali che vegetali). Ad essi ci si riferisce con il termine di metaboliti primari.

A differenza della situazione appena descritta, esiste un vasto gruppo di prodotti naturali di origine microbica o vegetale (come alcaloidi, terpeni, fenoli, micotossine, etc.) che sono presenti sporadicamente in natura e che dunque costituiscono delle importanti informazioni di carattere tassonomico.

Sembrano non svolgere una funzione esplicita e diretta nell'attività di crescita dell'organismo e per questo motivo sono definiti come metaboliti secondari (Bu'lock, 1965; Bate-Smith, 1984; Gottlieb, 1989, 1990). Il confine tra le due aree metaboliche prima descritte è spesso labile oltre che transitorio (nuove scoperte intervengono spesso a modificare le nostre conoscenze), e necessariamente deve essere considerato utile soprattutto da un punto di vista didattico (Beart, et al., 1985). La storia alla base dell'evoluzione dei metaboliti secondari ha come premessa fondamentale la capacità della pianta, in risposta alle condizioni ambientali ed ecologiche, di evolvere uno stratagemma di biosintesi e differenziazione chimica in grado di meglio far fronte alla pressione ambientale. Un aspetto particolare di questo concetto è rappresentato dalla teoria co-evolutiva di piante ed animale, che può essere sintetizzato in queste due righe: la pressione selettiva esercitata dagli erbivori determina un'indicazione evolutiva nella direzione della biosintesi di prodotti secondari tossici, o repellenti per gli erbivori stessi (Janzen, 1969); e che buona parte della finalità della sintesi di composti (quali terpeni, alcaloidi e fenoli) è da ricercare nella funzione di agente protettivo impiegato dalla pianta nella sua lotta per la sopravvivenza (Harborne, 1977). La teoria co-evolutiva è anche associabile tra pianta e agenti abiotici, nel caso specifico dei flavonoidi, in difesa contro una sovraesposizione ai raggi ultravioletti (Stafford, 1990). Inoltre l'evoluzione non deve essere vista solo in termini di difesa ma anche attrattivi. Sempre i flavonoidi hanno un ruolo di primaria importanza nella pigmentazione dei fiori per attrarre impollinatori per indurre la fecondazione e perpetuare la specie. (Winkel, 2001) In un concetto evolutivo si può notare come la pianta anche da un punto di economia delle risorse energetiche sfrutti

una ampia ma unica classe di metaboliti secondari per differenti azioni (di difesa, di protezione e attrattiva).

## **I Fenoli**

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, la quale comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici.

Sebbene un cospicuo numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza di una frazione fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali. I fenoli sono particolarmente importanti nei prodotti ortofrutticoli in cui hanno un ruolo preminente nel determinare colore e sapore. In particolare si associa agli acidi fenolici il sapore acidulo, ai tannini l'astringenza, mentre il sapore amaro è spesso associato ad alcuni flavonoidi quali naringenina e neoesperidina. Il colore, infine, viene determinato dalla presenza degli antociani e dalle loro caratteristiche reazioni di co-pigmentazione. Il contenuto dei composti fenolici nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle condizioni pedoclimatiche. In tabella 1.1 sono riportate alcune tra le principali classi di sostanze fenoliche di origine vegetale. Accanto alle forme monomere vi sono quattro importanti gruppi di polimeri fenolici: lignine, tannini, melanine e suberina. Attualmente sono state identificate diverse migliaia di strutture fenoliche, tra le quali la classe dei flavonoidi è quella numericamente più consistente: sono stati identificati oltre 4000 glicosidi e più di 1.800 agliconi appartenenti a questa classe nella quale si

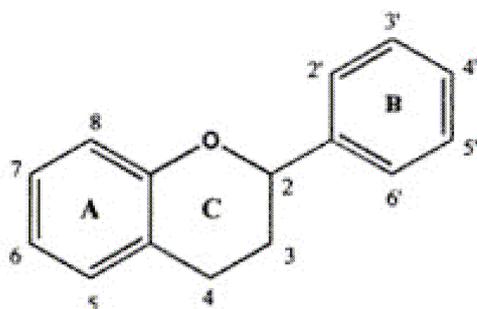
fanno rientrare 13 tipi di flavonoidi *sensu stricto* ed almeno 10 tipi di isoflavonoidi (Forkmann and Martens, 2001).

Tabella 1.1 Le principali classi di composti fenolici nelle piante.

Numero di atomi di carbonio	Scheletro base	Classe
6	$C_6$	Fenoli semplici Benzochinoni
7	$C_6C_1$	Acidi fenolici
8	$C_6C_2$	Acetofenoni Acidi fenilacetici
9	$C_6C_3$	Acidi idrossicinnamici Fenilpropeni Cumarine Isocumarine Cromoni
10	$C_6C_4$	Naftochinoni
13	$C_6C_1C_6$	Xantoni
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrachinoni
15	$C_6C_3C_6$	Flavonoidi Isoflavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	Lignani Neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	Biflavonoidi
n	$(C_6C)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6C_3C)_n$	Lignine Catecol-melanine Tannini condensati

## I Flavonoidi

I flavonoidi (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) costituiscono una grande classe di composti ubiquitari nelle piante superiori. La struttura chimica di questi composti, presenti in tutte le parti della pianta, é basato su uno scheletro C<sub>15</sub> con un anello cromonico legato ad un secondo anello aromatico (B) in posizione 2, 3 o 4. (Fig.1.1)



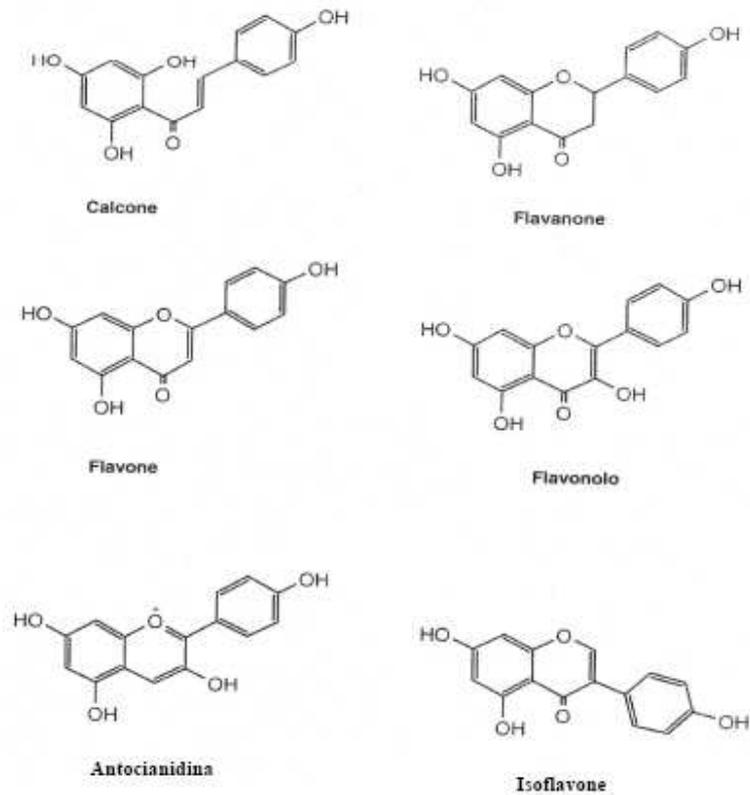
**Figura 1.1:** Struttura base dei flavonoidi.

In alcuni casi l'anello eterociclo C può presentarsi in una forma isomerica aperta (calconi) oppure viene sostituito da un anello a 5 atomi di carbonio (auroni). I vari sottogruppi di flavonoidi vengono classificati in base allo stato di ossidazione dell'anello eterociclico ed alla posizione dell'anello B. Molti di questi hanno l'anello B in posizione 2 sull'anello eterociclo (flavanoni, flavoni, flavonoli ed antocianine), negli isoflavonoidi l'anello B è in posizione 3 mentre nelle 4-fenilcumarine (neoflavonoidi) l'anello B è in posizione 4. Esistono, infine, delle strutture oligomeriche, quali i biflavonoidi [(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>], come le proantocianidine [(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub>]. Normalmente i flavonoidi si ritrovano in natura in forma glicosilata, con diversi tipi di zucchero attaccati ai gruppi -OH. Gli zuccheri, a loro volta, possono essere legati ad un sostituente

acilico, quali malonato, p-cumarato, caffeato e ferulato. Infine, i flavoni, a differenza da altri tipi di flavonoidi, possono formare dei C-glicosidi impegnando le posizioni 6 ed 8 dello scheletro base.

In alcuni casi la funzione ossidrilica può essere mascherata da una O-metilazione o da altro tipo di sostituzione, inoltre, molti composti accanto agli -OH fenolici contengono altri gruppi funzionali che influenzano le loro proprietà chimico-fisiche.

Essi presentano molti gruppi ossidrilici su strutture ad anello che conferiscono loro proprietà antiossidanti. Questi polifenoli vegetali possono funzionare da agenti riducenti, da antiossidanti donatori di idrogeno grazie al loro potenziale redox, da chelanti di metalli e come quenchers (spegnitori dell'ossigeno singoletto). Complessando gli ioni ferro i flavonoidi pongono fine alla reazione di Fenton guidata dal superossido (Rice-Evans et al., 1996). Altra importante attività svolta da alcuni flavonoidi è rappresentata dal complessamento anche del rame (Brown et al., 1998). Riducendo il radicale tocoferolo i flavonoidi contribuiscono alla rigenerazione del tocoferolo stesso. La famiglia dei flavonoidi (Fig. 1.2) include sei sottogruppi maggiori, ritrovabili in tutte le piante superiori: i calconi, i flavoni, i flavonoli, le antocianine e i tannini condensati (o pro-antocianidine); un settimo gruppo, gli auronidi, è diffuso ma non ubiquitario.



**Fig 1.2 Famiglia dei flavonoidi** sei sottogruppi maggiori, ritrovabili in tutte le piante superiori: i calconi, i flavoni, i flavonoli, le antocianine e i tannini condensati (o pro-antocianidine)

### Biosintesi dei flavonoidi

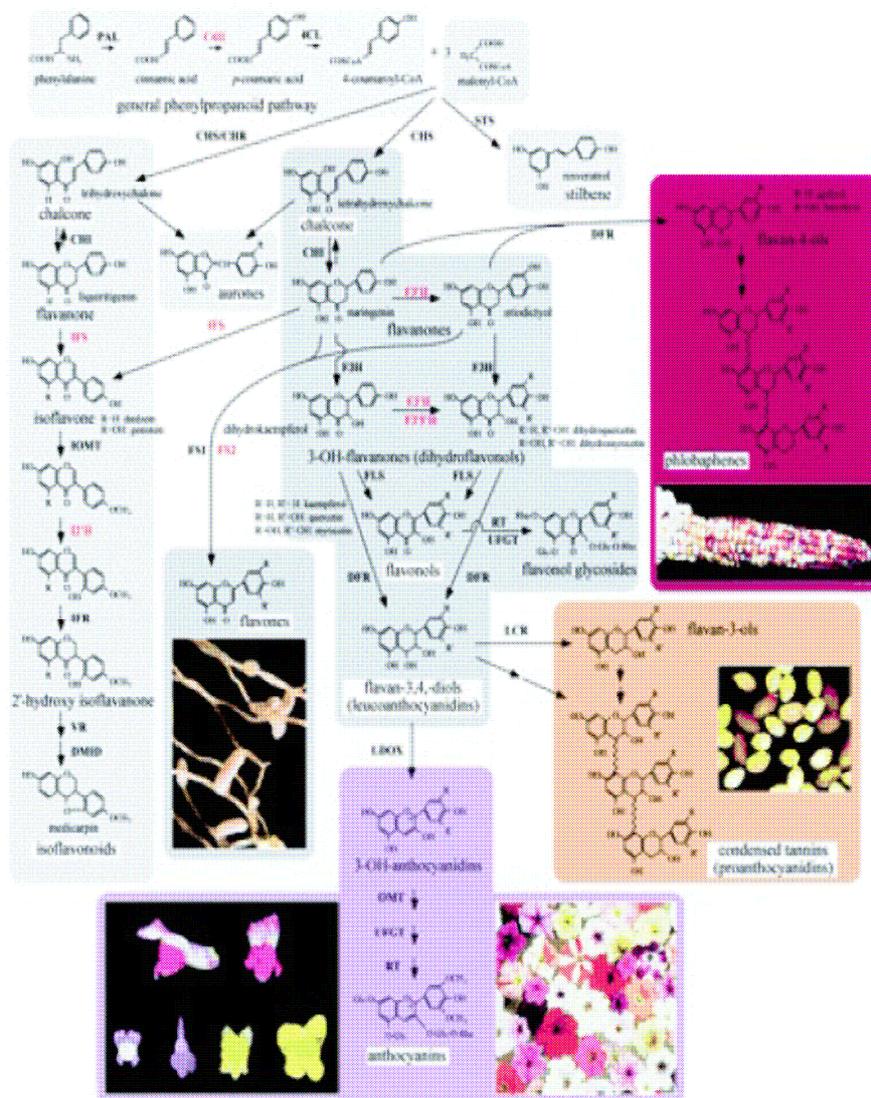
Tutti i flavonoidi, normalmente, posseggono uno scheletro base C6-C3-C6, composto da una unità C6 (anello A) e da una unità C6-C3 (anello B ed atomi di carbonio 2, 3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro base vengono originati da due distinti pathways. L'anello B, con gli atomi di carbonio 2, 3, e 4, viene fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità acetato. Alcune classi di flavonoidi (calconi, diidrocalconi ed auron) differiscono

strutturalmente dal tipico scheletro base che contraddistingue le altre classi di flavonoidi, ma da un punto di vista biosintetico sono strettamente correlate alle altre classi di flavonoidi. L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi catalizza la formazione dello scheletro C15 dei flavonoidi a partire da malonil-CoA e p-cumaroil-CoA (derivato attivato dell'acido p-cumarico). I precursori dei flavonoidi derivano entrambi dai carboidrati: il malonil-CoA si forma a partire da acetil-CoA e CO<sub>2</sub>, una reazione catalizzata da acetil-CoA carbossilasi (ACC), il p-cumaroil-CoA e gli analoghi esteri idrossicinnamici del CoA vengono forniti dal metabolismo fenilpropanoidico. Il prodotto di questa condensazione dovrebbe essere un calcone, mentre normalmente si è osservato l'accumulo del flavanone naringenina: pertanto, l'enzima chiave di questo primo step nella biosintesi dei flavonoidi è stato chiamato, in un primo tempo, flavanone sintasi (FS). Una tale conclusione non è, comunque, coerente con i risultati di alcuni esperimenti fatti con l'ausilio di calconi marcati (Reddy AR et al. 1996), nè è in grado di spiegare il ruolo di un altro enzima coinvolto nella biosintesi dei flavonoidi, la calcone isomerasi (CHI). Ulteriori ricerche condotte con l'ausilio di mutanti di fiori di *Callistephus chinensis* (Li F. et al. 2006) e di *Dianthus caryophyllus* (Itoh Y. et al. 2002), che accumulano il calcone a spese di antocianine ed altri flavonoidi, hanno dimostrato che: i) il primo prodotto nelle biosintesi dei flavonoidi è un calcone, ii) la CHI catalizza la ciclizzazione del calcone in maniera stereospecifica con conseguente formazione del flavanone. E', pertanto, la calcone sintasi (CHS) l'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi. Questo enzima catalizza la condensazione in più stadi di tre unità acetato, derivanti da malonil-CoA, con un opportuno derivato attivato dell'acido cinnamico,

normalmente il p-cumaroil-CoA, con conseguente formazione di un calcone, 4,2',4',6'-tetraidrossicalcone, dal quale si originano tutte le strutture dei flavonoidi (Figura 1.2). La CHS, in cooperazione con una riduttasi NADPH-dipendente, la polichetide riduttasi (PKR), catalizza anche la formazione del 4,2',4'-triidrossicalcone (6'-deossicalcone = isoliquiritigetina) e del corrispondente 5-deossiflavanone (liquiritigetina), sempre utilizzando malonil-CoA e p-cumaroil-CoA. Sia il tetraidrossicalcone che il 6'-deossicalcone possono essere utilizzati come precursori diretti nella sintesi degli auron. Negli stadi successivi della biosintesi, calconi, flavanoni, diidroflavonoli e flavan-3,4-dioli fungono da precursori nella biosintesi degli antociani, mentre i pathways che portano alla formazione di flavoni e flavonoli rappresentano delle ramificazioni degli stadi iniziali della biosintesi dei flavonoidi. La tipica struttura dei flavonoidi si forma in seguito ad una conversione stereospecifica del calcone a 2S-flavanone (naringenina, liquiritigetina), una reazione catalizzata dall'enzima calcone isomerasi (CHI). Il flavanone rappresenta uno dei principali punti di ramificazione nella biosintesi dei flavonoidi. La naringenina (un 5-idrossiflavanone) funge da intermedio per la biosintesi di isoflavoni, flavoni, diidroflavonoli e flavan-4-oli. La liquiritigenina (un 5-deossiflavanone) funge da precursore nel pathway degli isoflavoni, mentre resta da dimostrare la sua conversione in altri 5-deossiflavonoidi (flavonoidi mancanti dell'ossidrile sul C5, particolarmente comuni nelle leguminose).

La formazione degli isoflavoni a partire dai flavanoni coinvolge il riarrangiamento ossidativo del flavanone, comprendente uno shift (migrazione) 2-3 del gruppo arilico. La reazione viene catalizzata da una 2-idrossiflavanone sintasi (IFS), in cooperazione con una deidratasi che elimina

una molecola di acqua. Substrati della IFS possono essere sia i 5-idrossiflavanoni che i 5-deossiflavanoni. Genisteina e daidzeina, a loro volta, sono intermedi nella biosintesi di tutti gli altri isoflavonoidi, inclusi i pterocarpani. L'introduzione di un doppio legame tra il C2 ed il C3 del flavanone porta alla formazione dei flavoni, una classe di flavonoidi quantitativamente molto importante nei tessuti vegetali. La reazione viene catalizzata da due differenti flavone sintasi (FNA I ed FNS II), la prima ritrovata in colture cellulari di prezzemolo richiede come cofattori 2-ossiglutarato, Fe<sup>++</sup> ed ascorbato, la seconda, FNS II; richiede per esplicare la sua azione catalitica NADPH ed ossigeno molecolare ed viene ritrovata comunemente negli altri tessuti vegetali.



**Figura 1.3** - Alcuni esempi dell'enorme varietà di prodotti finali ai quali si giunge attraverso l'aggiunta di zuccheri. I nomi degli enzimi sono abbreviati come segue: cinnamato-4-idrossilasi (C4H); calcone isomerasi (CHI); calcone reductasi (CHR); calcone sintasi(CHS); 4-cumaril-CoA-ligasi (4CL); diidroflavonol-4-reduttasi (DFR); 7,2 -diidrossi,4 metossiisoflavanolo deidratasi (DMID); flavanone 3-idrossilasi (F3H); flacone sintasi (FSI e FSII); flavonolo-3 -idrossilasi (F3 H) o flavonolo-3 5 -idrossilasi (F3 5 H); isoflavone O-metiltransferasi (IOMT); isoflavone reductasi (IFR); isoflavone-2 –idrossilasi (I2 H); isoflavone sintasi (IFS), leucoantocianidina diossigenasi (LDOX); leucoantocianidina riduttasi (LCR); O-metiltransferasi (OMT); Phe ammonio liasi (PAL); ramnosil transferasi (RT); stilbene sintasi (STS); UDPG-flavonoid glucosil transferasi (UFGT) e vestitone reductasi (VR). Da Winkel-Shirley, *Plant physiology*, Vol.126, 485-493 (2001).

L'idrossilazione del flavanone sul C3 porta alla formazione dei diidroflavonoli, una reazione catalizzata dalla flavanone-3-idrossilasi (FHT), che, analogamente alla FNS I, è una diossigenasi 2-ossiglutarato-dipendente. I diidroflavonoli sono i substrati diretti nella sintesi dei flavonoli, catalizzata da una flavonolo sintasi (FLS), ancora una diossigenasi 2-ossiglutarato dipendente, e dei flavan-3,4-dioli (leucoantocianidine), nonché intermedi nella formazione di catechine (flavan-3-oli), proantocianidine (dimeri ed oligomeri di flavan-3-oli) ed antocianidine. La riduzione stereospecifica in posizione 4 dei diidroflavonoli, catalizzata da una diidroflavonolo-4-riduttasi (DFR) con NADPH come cofattore, porta alla formazione delle leucoantocianidine. Un enzima analogo alla DFR, la flavanone-4-riduttasi (FNR) catalizza la riduzione NADPH-dipendente del gruppo carbonilico in posizione 4 del flavanone con conseguente formazione dei flavan-4-oli, un tipo di leucoantocianidine, che costituiscono i precursori immediati di apigeninidina e luteolinidina, delle 3-deossiantocianidine rispettivamente di colore giallo-arancio e arancio-rosso. Le leucoantocianidine sono i precursori immediati nella sintesi di catechine e proantocianidine. Le catechine vengono prodotte in seguito ad una reazione di riduzione in posizione 4 della leucoantocianidina catalizzata da una leucoantocianidina-4-riduttasi (LAR). Esistono, infine, prove evidenti che le leucoantocianidine sono dei precursori nella sintesi delle antocianine. E' possibile che, nell'ambito di una sequenza di reazioni ancora da elucidare, una diossigenasi introduca un doppio legame tra il C2 ed il C3 della leucoantocianidina. il composto risultante, il 2-flaven-3,4-cis-diolo, può isomerizzare a formare un composto termodinamicamente più stabile, il 3-flaven-2,3-diolo, che probabilmente si disidrata spontaneamente formando

l'antocianidina. La glicosilazione in posizione 3 dell'antocianidina, o di un suo intermedio, dovrebbe essere parte integrante della sequenza completa di reazioni, in quanto le comuni antocianidine sono instabili nelle normali condizioni fisiologiche della cellula vegetale. Agli enzimi finora citati vanno aggiunti numerosi altri enzimi, i quali catalizzano delle reazioni che portano ad una modificazione dello scheletro base dei flavonoidi: reazioni di idrossilazione, glicosilazione, acilazione, importanti nel conferire caratteristiche di stabilità ed idrofilicità alle molecole, mentre reazioni di metilazione e prenilazione, conferiscono ai flavonoidi caratteristiche di lipofilicità ed attività antimicrobica. In questo contesto una questione molto dibattuta è stata: in quale stadio viene definito il pattern di sostituzione dell'anello B. Esistono due possibilità: incorporazione dei sostituenti a livello di derivato dell'acido cinnamico prima della formazione dello scheletro C15, ovvero determinazione del pattern di sostituzione a livello di C15, che è l'ipotesi attualmente prevalente, mentre la produzione di flavonoidi con un alto grado di sostituzione nell'anello B derivante dal corrispondente derivato cinnamico è una via secondaria osservata soltanto in poche specie vegetali. L'introduzione di gruppi -OH in 3' e 5' viene catalizzata da specifiche ossigenasi, flavonoide 3'-idrossilasi (F3'H) e flavonoide-3',5'-idrossilasi (F3',5'H), che utilizzano flavonoidi come substrato. La successiva metilazione di questi ossidrili viene catalizzata da specifiche metiltrasferasi. Quanto sopra porta, quindi, alla conclusione che il p-cumaroil-CoA rappresenta il principale substrato fisiologico per la reazione catalizzata da CHS, il cui prodotto sono dei 4'-idrossi flavonoidi. Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nell'elucidazione della biosintesi dei flavonoidi. Restano, però, ancora da

chiarire alcuni aspetti relativi agli ultimi stadi della sintesi delle antocianine, alla sintesi dell'epicatechina e delle proantocianidine ed, infine, relativamente alla sintesi di alcune classi di flavonoidi numericamente meno consistenti, quali auron e diidrocalconi. Restano, infine, da chiarire anche alcuni aspetti relativi alla localizzazione subcellulare dei flavonoidi ed al meccanismo con cui i flavonoidi vengono trasportati nel vacuolo.

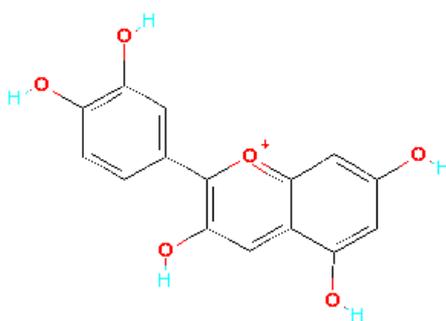
### **Ruolo dei composti flavonoici nell'ecologia della pianta**

L'impiego di tecniche analitiche sempre più potenti ha permesso l'isolamento ed identificazione di un numero veramente considerevole di composti attribuibili per struttura chimica e significato metabolico, alla ormai sempre più ampia famiglia dei flavonoidi.

La distribuzione di questi composti varia in funzione dell'organo preso in considerazione per l'analisi ed anche in funzione della popolazione all'interno della stessa specie. I problemi nell'espore le diverse funzioni svolte dai composti flavonoici nel metabolismo vegetale dipendono, oltre che dalla già citata enorme varietà di strutture, anche dalla loro presenza sotto forma di strutture miste a funzione complessa. In alcuni casi l'attività di questi metaboliti secondari può essere influente sul metabolismo primario, ad esempio sulla crescita stessa. Le proantocianidine hanno effetto diverso sull'attività di alcuni ormoni endogeni, con importanti conseguenze sul metabolismo dell'intera pianta.

## Colorazione dei fiori e dei frutti

È una delle funzioni meglio conosciute e studiate attribuibili alla classe dei flavonoidi (Brouillard and Dangles, 1994), strettamente connessa con l'effetto di attrazione esercitato sugli insetti impollinatori per una diffusione e perpetrazione della specie più ampia possibile. Responsabile della colorazione sono le antocianine, in grado di conferire colori dal salmone-rosa, al rosso, al magenta e viola fino al blu intenso (Haslam, 1995). La struttura della cianidina è riportata di seguito (Fig. 1.4).



**Figura 1.4** Struttura della cianidina

Le tre principali molecole cromofore (pelargonidina, cianidina e delphinidina) compaiono singolarmente o occasionalmente in maniera mista. Le antocianine sono in genere idrofiliche e presenti generalmente nella cellula a livello del vacuolo. Si riscontrano anche in altri tessuti come foglie, germogli e radici, ma generalmente non sono visibili in quanto completamente coperte dalla presenza predominante del verde della clorofilla. Solamente in

determinate condizioni, ad esempio foglie in fase senescente o in germogli in rapida crescita, le antocianine risultano visibili (Cooper-Driver, 2001). Nel caso delle foglie in rapida crescita un aspetto caratteristico di queste condizioni è la formazione potenziale di un eccesso di perossido, perossido d'idrogeno e di altri radicali dell'ossigeno a livello soprattutto dei vacuoli. Le antocianine parteciperebbero all'interruzione della propagazione di questi radicali liberi attraverso un'azione anti-ossidante, proteggendo dunque la pianta da danni ossidativi (Yamasaki, 1997)

Antocianine con la medesima struttura cromofora possono determinare colorazioni diverse (Goodwing, 1988). Proprio in questo ambito i co-pigmenti possono svolgere un ruolo determinante nella espressione finale della colorazione. In assenza di altre sostanze, con valori di pH vacuolari compresi tra 4 e 6, gran parte delle antocianine si presentano sostanzialmente incolori ed è dunque evidente l'importante ruolo che le co-pigmentazioni, inter ed intra molecolare possono svolgere nella determinazione derivante dalle antocianine (Figueiredo et al., 1996). I principali co-pigmenti intermolecolari sono gli esteri idrossicinnamici, l'acido clorogenico, i tannini e le forme glicosilate di flavononi e flavonoli. La loro funzione sembra essere quella di rendere più stabile il colore attraverso l'istaurarsi di forti legami tra i loro nuclei aromatici e quelli del pigmento. Anche la mutilazione o la formazione di un legame con uno zucchero sembra incrementare la stabilità del pigmento, pur non avendo un effetto diretto sulla colorazione. Con co-pigmentazione intramolecolare si intende la presenza di uno ione metallo come parte strutturante il pigmento antociano (Goto et al., 1986). Complessi di antocianine con magnesio e ferro a

funzione chelante, sono state isolate nei petali di *Commelina communis* e *Centaurea cyanus*.

### **Protezione dai raggi UV-B**

Le radiazioni ultraviolette sono convenzionalmente divise in tre bande caratterizzate da differenti significati ecologici. Tra queste la banda UV-B (tra i 280nm e i 320nm) è quella con lunghezze d'onda inferiori e la più alta energia. Può penetrare la fascia di ozono della stratosfera e, quindi, causare potenziali danni alla vita vegetale. Allo stato attuale, nonostante l'intensa attività di ricerca svolta in questo campo, troppo pochi sono gli studi sugli effetti prodotti da dosi diverse di raggi UV-B per giungere a risposte di carattere generale. Nonostante prese di posizione caute sulla effettiva pericolosità del fenomeno (Paul, 2001), è chiaro che lo studio degli effetti fisiologici e biochimici che spieghino la capacità delle piante ad adattarsi a condizioni di crescenti concentrazioni di radiazioni UV-B nell'ambiente, rappresenti una tematica di ricerca oltremodo attuale.

La resistenza agli effetti prodotti dai raggi UV-B può estricarsi secondo modalità diverse, una delle quali è rappresentata dai pigmenti di flavonoidi, universalmente presenti nei tessuti fogliari delle specie vegetali. Il ruolo dei flavonoidi come agente UV-protettori (Takeda et al., 1994; Bornman 2000) è imputabile alla capacità di questi pigmenti di assorbire radiazioni luminose nella regione compresa tra i 280 e i 320 nm circa e quindi di agire come filtri UV in grado di proteggere da possibili danni i sottostanti tessuti fotosintetici fogliari. Un discreto numero di sperimentazioni di carattere fisiologico condotte da strutture di ricerca in tutto il mondo, hanno fornito

sufficienti evidenze che piante sottoposte a quantità artificialmente controllate di radiazioni UV-B rispondono alterando il loro normale metabolismo biosintetico dei flavonoidi, allo scopo di contrastare gli effetti dannosi provocati dalle radiazioni UV in eccesso, come la fotoinibizione, il danneggiamento del DNA e tutta una serie di situazioni di stress che vanno dall'alterazione diretta della sintesi di costituenti metabolici all'eliminazione di sistemi di protezione naturale (Zobel et al., 1994; Schnitzler et al., 1994; Heimler, 2000; Buffoni et al., 2000). I cambiamenti osservati dei flavonoidi riguardano non solo le cellule dell'epidermide della superficie della lamina fogliare, ma anche i flavonoidi presenti in altre conformazioni anatomiche, come le cere ed i tricomi fogliari.

### **Interazione piante-animale**

I flavonoidi, assieme agli altri polifenoli, sono responsabili di un importante ruolo nella protezione della pianta nei confronti dell'attacco d'insetti e di mammiferi erbivori le ricerche hanno messo in evidenza come classi diverse di composti fenolici siano interessate da questa particolare funzione. È stato rilevato con forme polimeriche dei flavonoidi, come le procianidine) svolgano un ruolo importante nella difesa delle piante dagli erbivori. Ad esempio è stata stabilita una forte relazione negativa tra la concentrazione di procianidine a livello delle foglie e delle gemme, e la fecondità dell'afide, *Aphis craccivora*, che si nutre dei soluti presenti nel floema. I genotipi resistenti, che si differenziano per una concentrazione di procianidine elevata, ospitano dunque solo la metà degli afidi presenti nei genotipi a bassa concentrazione di procianidine. È da notare come, la

concentrazione di questi polimeri sia limitata alle parti anatomiche direttamente attaccate dagli afidi, come le gemme (Grayer et al., 1992). Anche altre classi di composti di più basso peso molecolare sono state oggetto di indagine per verificare il loro ruolo nell'interazione pianta-animale. Elevate concentrazioni di glicoflavoni sono presenti in cultivar di riso resistenti alla specie *Nilaparvata lugens* (cavalletta marrone) (Grayer et al., 1994). Il flavone sacuretina si forma in piante di riso in risposta ad attacchi di nematodi e di altri agenti di natura diversa, come radioni UV, infezioni fungine, eccetera ed è dunque parzialmente coinvolto nella protezione della pianta dalle malattie (Dillon et al., 1997).

Un'altra classe di flavonoidi in grado di interagire con insetti litofagi è quella degli isoflavonoidi. Sono presenti in forma attiva spesso a livello della superficie fogliare e possono in questo modo entrare in contatto immediatamente con il litofago. A tale riguardo, un esempio è quello della resistenza agli acari da parte della specie *Trifolium subterraneum*, proporzionale alla concentrazione di isoflavoni sulla superficie fogliare (Wang et al., 1999).

### **Proprietà mediche e dietetiche**

Lo studio in ambito medico e la determinazione delle proprietà benefiche ad essi imputabile sulla salute umana, rappresenta uno dei più interessanti campi di ricerca correntemente applicato ai flavonoidi. Vista l'ampiezza e la complessità delle probabili funzioni riconducibili ad essi in ambito medico, di seguito verranno elencati sinteticamente alcuni degli aspetti più interessanti finora emersi.

È in primo luogo importante sottolineare la capacità anti-ossidante connessa alle caratteristiche biochimiche dei flavonoidi (Elstner et al., 1994). La funzione protettiva svolta dai flavonoidi nei confronti di sostanze reattive ossigenate (Reactive Oxygen Species – ROS, radicali liberi dell'ossigeno, superossidi, perossidi d'idrogeno, etc., Cheeseman and Slater, 1993), sembrerebbe in relazione con la più bassa incidenza di alcune patologie cardiovascolari e oncologiche riscontrata in popolazioni caratterizzate da una dieta ricca di frutta e verdura (alimenti cioè ad elevato apporto di vitamine ed altri composti anti-ossidanti come i flavonoidi). Le reazioni di perossidazione riguardano diverse sostanze (acidi grassi polinsaturi, fosfolipidi, DNA, colesterolo, etc.) ma soprattutto i costituenti lipidici delle membrane cellulari, che sono particolarmente soggette a progressive e distruttive reazioni a catena. La capacità anti-ossidante dei flavonoidi può variare in funzione della loro struttura molecolare. La presenza di un gruppo carbonilico in posizione C-4, unitamente al doppio legame C-2 e C-3, sono infatti caratteristici di un alto potere anti-ossidante della molecola (Das and Pereira, 1990); gli isoflavoni sono più attivi rispetto ai flavoni per la presenza del gruppo carbonilico in posizione 4 ed ossidrilico in posizione 5 (Miyase et al., 1999; 1999b). Anche l'effetto chelante sui metalli da parte dei diidrossiflavonoidi può essere importante per la loro funzione anti-ossidante (Shahidi et al., 1991). Saggi di valutazione della perossidazione lipidica, hanno permesso di evidenziare la potente azione inibente della perossidazione non enzimatica da parte di composti appartenenti alla classe dei flavoni glicosidici in *Sideritis javalambrensis* (Labiatae; Rios et al., 1992).

I flavonoidi hanno dimostrato inoltre di poter agire come anti-infiammatori. Molti principi della medicina non tradizionale (soprattutto quella orientale) si basano appunto sull'impiego di particolari specie vegetali, i cui effetti benefici vengono oggi attribuiti, in parte, ai composti fenolici dei quali sono state evidenziate elevate concentrazioni. Diverse sono le tipologie di composti ad affetto anti-infiammatorio. Le antocianine ad esempio presenti nelle ciliegie acide ed in particolare il loro aglicone cianidina, sono state evidenziate come in grado di ridurre i problemi di artrite. Altri flavonoidi semplici, infine, come apigenina e quercitina hanno evidenziato un'attività anti-infiammatoria (Koganov et al., 1999).

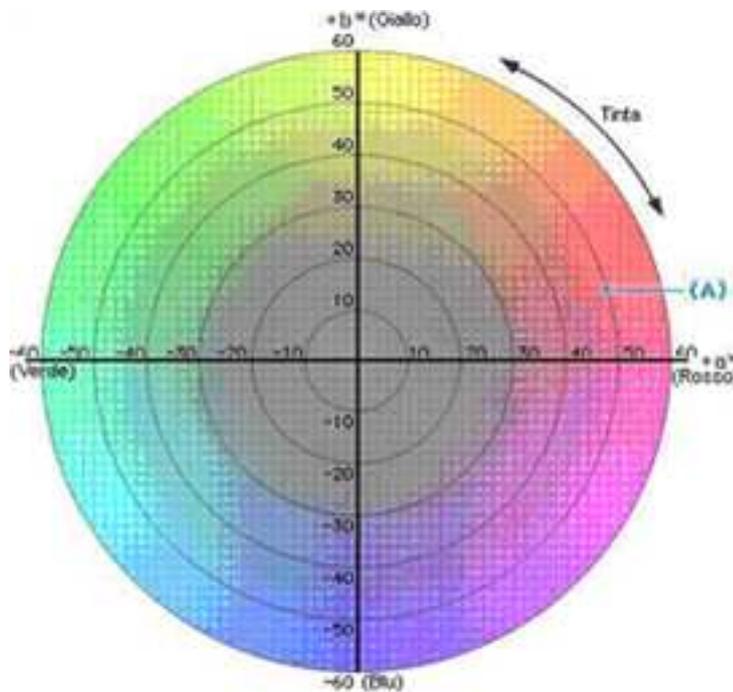
### **Alterazione della via biosintetica dei flavonoidi**

La possibilità di intervenire nella via biosintetica dei composti fenolici rappresenta un settore oltremodo interessante, soprattutto nei termini di una immediata ricaduta in ambito economico e nella pratica colturale. L'ottenimento di piante che, grazie alla disponibilità di un pattern di composti fenolici particolari, esprimano un colore attraente e nello stesso tempo stabile senza interferire nella forma e nel sapore del frutto rappresenterebbe un importante passo avanti nella realizzazione di nuove cultivar capaci di ritagliarsi un proprio segmento di mercato. Le difficoltà incontrate nel miglioramento genetico del pero sono dovute anche alla difficoltà di migliorarne la qualità in quanto si tratta di un complesso di caratteri poligenici difficilmente concentrabili in un solo genotipo. A differenza di altre specie (come ad esempio il pesco) per le quali esistono ampie segmentazioni tipologiche di frutti, le pere sono oggetto di una semplificazione merceologica

(anche di tipo qualitativo) che il mercato ha finora omologato, ma che in futuro potrebbe subire profonde evoluzioni.

### **Misurazione del colore dei frutti: colorimetro**

Lo spazio di colore  $L^* a^* b^*$  (noto anche come CIELAB) è attualmente uno degli spazi di colore più diffusi per la misurazione del colore di un oggetto ed è ampiamente usato in tutti i campi. È uno degli spazi colorimetrici uniformi definiti nel 1976 dalla CIE ai fine di ridurre uno dei principali problemi dell'originale spazio di colori  $Yxy$ : le distanze uguali sul diagramma di cromaticità  $x, y$  non corrispondevano alle differenze di colore percepite come uguali. In questo spazio di colori,  $L^*$  indica la luminosità mentre  $a^*$  e  $b^*$  le coordinate di cromaticità. La figura 1.4 indica il diagramma di cromaticità  $a^*, b^*$ . In questo diagramma,  $a^*$  e  $b^*$  indicano le direzioni del colore:  $+a^*$  è la direzione del rosso,  $-a^*$  è la direzione del verde,  $+b^*$  è la direzione del giallo e  $-b^*$  è la direzione del blu. Il centro è acromatico; quando i valori  $a^*$  e  $b^*$  aumentano ed il punto si sposta dal centro, la saturazione del colore aumenta (Fig 1.5).



**Figura 1.5** Diagramma di cromaticità

Il colorimetro rende possibile la semplice e precisa quantificazione dei colori, cosa che non riesce a fare nemmeno l'occhio umano più esercitato. Diversamente dalle espressioni soggettive comunemente usate per descrivere i colori con le parole, i colorimetri esprimono i colori numericamente secondo degli standard internazionali. Quando i colori vengono espressi in questo modo si è sicuri che la loro comprensione sarà universale. Inoltre la percezione soggettiva di un singolo colore può cambiare a seconda dello sfondo o della sorgente che illumina l'oggetto. I colorimetri hanno sensibilità corrispondenti a quelle dell'occhio umano; tuttavia, poiché effettuano sempre le misurazioni usando la stessa sorgente luminosa e lo stesso sistema di illuminazione, le condizioni di misura saranno sempre le stesse, indipendentemente dal fatto che sia giorno o notte, o che ci si trovi in spazi interni o all'esterno. Questo facilita delle misurazioni accurate.

## **Mutazioni**

Ogni cambiamento nella sequenza del DNA è una mutazione. Si possono suddividere le mutazioni in due classi:

- ◇ una mutazione puntiforme è un cambiamento che interessa una singola base in un gene. Ciò provoca un cambiamento nella corrispondente proteina prodotta da quel gene.
- ◇ Un riarrangiamento è un cambiamento che coinvolge una regione estesa. I tipi più semplici di riarrangiamento sono le inserzioni (aggiunta di materiale genetico) e le delezioni di un tratto del gene.

Una mutazione puntiforme cambia soltanto una coppia di basi. Si possono distinguere due tipi di mutazioni puntiformi, a seconda della natura del cambiamento che si verifica quando una base viene sostituita con un'altra.

- ◇ La classe più comune è rappresentata dalle transizioni, ovvero dalle sostituzioni di una pirimidina con l'altra pirimidina, o di una purina con l'altra purina. Quindi una coppia G-C viene sostituita da una coppia A-T o viceversa.
- ◇ La classe meno comune è quella delle trasversioni, in cui una purina viene sostituita da una pirimidina o viceversa, per cui una coppia A-T diventa una coppia T-A, oppure G-C diventa C-G.

Le mutazioni dovute dalla sostituzione di una base spesso sono deboli; il mutante mantiene una certa funzionalità residua, quando il corrispondente cambiamento della sequenza polipeptidica non abolisce del tutto l'attività della proteina. Una mutazione puntiforme che altera una sola base modificherà soltanto il codone di cui quella base fa parte. Quindi un solo

aminoacido della proteina sarà influenzato. La sostituzione quindi potrà ridurre l'attività proteica ma è raro che l'abolisca del tutto. Anzi spesso le sostituzioni di una base nella posizione tre del codone non hanno alcun effetto sulla traduzione a causa della degenerazione del codice genetico.

Per molto tempo si è pensato che le mutazioni puntiformi rappresentassero la modalità principale di cambiamento dei geni. Ma oggi si sa che sono piuttosto frequenti anche inserzioni di lunghi tratti di materiale genetico aggiuntivo. La fonte di questo materiale è costituita da elementi trasponibili, ovvero sequenze del DNA che hanno la capacità di spostarsi da un sito ad un altro.

### **Trasposone**

Si definiscono trasposoni alcuni elementi genetici presenti nei cromosomi capaci di spostarsi da una posizione all'altra del genoma.

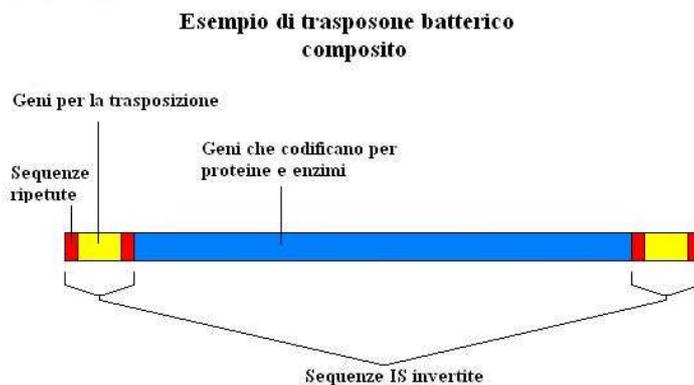
La diversa colorazione delle cariossidi di questa spiga di mais è il risultato dell'azione dei trasposoni.

I trasposoni, che vennero individuati inizialmente studiando le cariossidi (i chicchi) del mais, sono presenti in tutti gli esseri viventi, sia in quelli più sviluppati, come l'uomo, sia nei batteri. Fanno parte degli elementi trasponibili, assieme alle sequenze di inserzione (IS); i quali sono i trasposoni più semplici, costituiti da una regione interna, codificante per le proteine enzimatiche necessarie alla trasposizione (trasposasi), e da due sequenze di 10-40 bp simili tra loro che si trovano, disposte in posizione invertita, alle due estremità dell'elemento. Gli elementi IS si muovono generalmente attraverso

la trasposizione conservativa, nel senso che essi non vengono duplicati ma traspongono da un sito all'altro spostandosi dalla posizione iniziale.

I trasposoni si spostano all'interno di uno stesso cromosoma nel caso dei batteri oppure da un cromosoma ad un altro: per fare ciò hanno bisogno dell'enzima trasposasi, che viene codificato da geni presenti sui trasposoni stessi. I trasposoni presentano delle sequenze terminali invertite e si inseriscono in siti non omologhi, causando la formazione ai due lati di sequenze dirette ripetute, attraverso un taglio ineguale. Alcuni trasposoni (composti) presentano alle estremità delle IS mentre altri hanno sequenze ripetute più corte; i trasposoni possono contenere anche geni per la resistenza a un antibiotico e solitamente causano delle mutazioni, impedendo la trascrizione di un gene o ampliandola; possono inoltre attivare geni oncogeni o disattivare geni onco-soppressori.

## Trasposoni procarioti



**Figura 1.6** Esempio di trasposone batterico composito

I trasposoni procariotici contengono tutti i geni necessari alla integrazione e alla escissione dal genoma. In più, normalmente contengono anche dei geni

aggiuntivi, dalla funzione varia (come la resistenza agli antibiotici, o la capacità di sintetizzare una particolare molecola). I trasposoni batterici sono in grado sia di spostarsi tra posizioni diverse nel cromosoma batterico (che, a differenza di quelli eucariotici, è unico), sia di integrarsi in un plasmide. Ne esistono due tipi, i trasposoni composti e i trasposoni non composti.

- ◇ I trasposoni composti (Fig. 1.6) sono costituiti da una parte centrale, che contiene i geni, e da due parti laterali costituite da sequenze di inserzione IS (dette anche elementi IS), che presentano sequenze ripetute ed invertite di coppie di basi alle estremità. La trasposizione dei trasposoni composti è resa possibile proprio da tali elementi. Essi infatti producono gli enzimi trasposasi, necessari per lo spostamento. Le trasposasi inoltre hanno bisogno di riconoscere le ripetizioni invertite degli elementi IS alle estremità del trasposone, per iniziare il processo.
- ◇ I trasposoni non composti differiscono dai precedenti per il fatto di non presentare sequenze IS alle estremità. Possiedono invece essi stessi delle sequenze ripetute alle estremità, che sono necessarie per la trasposizione. Nei trasposoni non composti inoltre l'enzima trasposasi viene sintetizzato a partire dai geni della parte centrale del trasposone stesso.

### **Meccanismi di trasposizione nei procarioti**

Esistono diversi modelli per spiegare i meccanismi di trasposizione dei trasposoni procariotici. I due più accreditati sono il modello a cointegrazione e il modello conservativo.

- ◇ il modello a cointegrazione prevede la trasposizione di un trasposone da un cromosoma a un altro o tra due siti lontani di due cromosomi. Secondo

questo modello, la porzione di cromosoma che contiene il trasposone si fonde per breve tempo con la porzione di cromosoma accettrice. A questo punto il trasposone si duplica, e una delle copie si posiziona nel dna del cromosoma (o nella porzione di cromosoma) accettore, mentre l'altra rimane nella porzione donatrice. Questo tipo di trasposizione viene perciò anche chiamata trasposizione replicativa.

- ◇ nella trasposizione conservativa, detta anche non replicativa, avviene la trasposizione del trasposone da una posizione all'altra di un cromosoma senza che questo si replichi. Ciò significa che il trasposone si sposta fisicamente dalla posizione iniziale a quella finale.

### **Trasposoni eucarioti**

I trasposoni degli eucarioti sono molto simili, per struttura, a quelli procarioti. Possiedono geni che codificano per le proteine necessarie per la trasposizione e che permettono loro di excidersi e reintegrarsi in vari luoghi del genoma. Oltre ai geni coinvolti nei processi di trasposizione, la maggior parte di essi possiede anche numerosi altri geni, la cui funzione, però, è in larga parte ancora ignota. Come anche i trasposoni procariotici, possono causare mutazioni genetiche, inserendosi all'interno di geni funzionali e alterandone, o impedendone, le normali funzioni. Sono stati scoperti trasposoni praticamente in tutti gli organismi eucarioti, ma i più studiati sono quelli delle piante (particolarmente del mais), del moscerino della frutta e dell'uomo.

### **Trasposoni delle piante**

I trasposoni vegetali si distinguono in due tipi principali: gli elementi autonomi e gli elementi non autonomi.

- ◇ Gli elementi autonomi sono trasposoni capaci di trasportare da soli, perché possiedono tutti i geni necessari alla trasposizione. Questi trasposoni, quando si inseriscono in un gene, causano mutazioni instabili, perché possono in ogni momento trasportare nuovamente, restituendo al gene mutato le funzioni originarie.
- ◇ Gli elementi non autonomi sono trasposoni incapaci di trasportare da soli, perché privi di alcuni geni essenziali per questa funzione. Di norma, quando un elemento non autonomo si integra all'interno di un gene funzionale, causa una mutazione stabile (permanente), proprio per la sua incapacità di excidersi autonomamente. Tuttavia, se nello stesso genoma è presente anche un elemento autonomo, quest'ultimo è capace di fornire gli enzimi e i prodotti genici necessari per la trasposizione, permettendo così anche all'elemento non autonomo di trasportare.

La trasposizione dei trasposoni vegetali è sempre conservativa: ciò significa dunque che, quando uno di essi traspone, non si replica e non lascia una copia nella posizione cromosomica in cui si trovava precedentemente. La trasposizione avviene solo durante la replicazione del cromosoma in cui si trova il trasposone.

### **Trasposoni come mutageni**

I trasposoni possono causare mutazioni genetiche. Il processo di trasposizione può danneggiare il genoma della cellula ospite in molti modi:

- ◇ Un trasposone o un retrotrasposone che si inserisce in un gene ne modifica o, più spesso, ne impedisce l'espressione.
- ◇ Quando un trasposone lascia un gene, la funzionalità del gene stesso può ripristinarsi, ma frequentemente il gap che si forma quando il trasposone si excide non viene riparato correttamente, con risultati deleteri per l'espressione del gene.
- ◇ Copie multiple della stessa sequenza, come la sequenza "Alu" (così chiamato perché in grado di legare l'enzima Alu I), possono compromettere il corretto appaiamento dei cromosomi durante la mitosi, provocando crossing over errati, una delle maggiori cause di duplicazione cromosomica.

Inoltre, molti trasposoni possiedono promotori che permettono la loro trascrizione durante il processo di trasposizione. Questi promotori possono causare l'espressione eccessiva dei geni vicini, causando fenotipi anormali.

### **Retrotrasposoni**

In genetica, si definiscono retrotrasposoni dei frammenti di DNA capaci di trasciversi autonomamente in un intermedio ad RNA e conseguentemente replicarsi in diverse posizioni all'interno del genoma. Sono un tipo particolare di trasposoni e, come questi ultimi, fanno parte di quella classe di elementi genetici chiamati elementi trasponibili. Sono particolarmente abbondanti nelle piante, di cui costituiscono una frazione consistente dell'intero genoma, e negli esseri umani.

## **Trasposizione dei retrotrasposoni**

Lo spostamento di un retrotrasposone da una parte del genoma ad un'altra è detto trasposizione; in particolare, la trasposizione dei retrotrasposoni segue il modello della trasposizione replicativa. Secondo questo modello -comune anche ad alcuni tipi trasposoni ed alle sequenze di inserzione- quando l'elemento trasponibile si sposta in una nuova posizione del genoma ne rimane sempre una copia nella posizione originaria.

I retrotrasposoni traspongono copiandosi prima in un intermedio ad RNA e, successivamente, reversiono in DNA (attraverso la trascrittasi inversa) integrandosi in una nuova posizione all'interno del genoma. Questo meccanismo permette ai trasposoni di incrementare notevolmente e rapidamente la presenza delle loro copie all'interno del genoma, aumentando conseguentemente anche la grandezza del genoma stesso.

Come altri tipi di elementi trasponibili, i retrotrasposoni possono indurre mutazioni inserendosi casualmente all'interno di geni funzionali, alterandone o, in alcuni casi, impedendone l'espressione. Esistono tuttavia evidenze sperimentali che dimostrerebbero come la trasposizione e il mantenimento delle copie dei retrotrasposoni all'interno del genoma ospite siano regolate da geni presenti sia sui retrotrasposoni stessi che nel genoma dell'ospite. Questi geni coopererebbero nell'evitare che la trasposizione possa avere effetti deleteri sia sul retrotrasposone che sull'ospite. Ad ogni modo, la comprensione di come operino questi meccanismi, e di come possano essersi co-evoluti in modo da garantire la reciproca sopravvivenza di retrotrasposoni e ospiti è un campo di ricerca ancora aperto e in fase di sviluppo.

### **Tipi di retrotrasposoni**

Si distinguono due sottoclassi di retrotrasposoni: i retrotrasposoni che presentano alle estremità delle lunghe sequenze ripetute terminali (LTR, dall'inglese Long Terminal Repeat, per questo chiamati retrotrasposoni LTR) e i retrotrasposoni che non le presentano (retrotrasposoni non-LTR).

### **Trasposoni LTR**

I trasposoni LTR possiedono alle estremità sequenze ripetute, lunghe dalle 100 alle 5000 coppie di basi. Sono suddivisi a loro volta in due gruppi, i retrotrasposoni Ty1-copia simili e i retrotrasposoni Ty3-copia simili, in base alle loro sequenze genomiche e all'ordine dei geni codificati. Entrambi i gruppi si ritrovano in gran numero sia nelle piante (dalle più semplici alghe unicellulari fino alle angiosperme) che nei mammiferi, compreso l'uomo, di cui costituiscono approssimativamente l'8% dell'intero genoma.

### **Trasposoni non-LTR**

I trasposoni non-LTR non presentano sequenze ripetute alle estremità. Vengono suddivisi in due sottotipi, le brevi sequenze intersperse (SINE, dall'inglese Short Interspersed Nuclear Elements) e le lunghe sequenze intersperse (LINE, dall'inglese Long Interspersed Nuclear Elements). Le LINE sono lunghe sequenze di DNA (di più di 5000 coppie di basi). Codificano per 2 geni, uno dei quali presenta attività di trascrittasi inversa e di integrasi, permettendo la copia e la trasposizione sia di loro stessi, sia di altre di altre sequenze non codificanti (come le SINE). Poiché traspongono

replicandosi, le LINE son in grado di accrescere la grandezza di un genoma. Il genoma umano, per esempio, contiene oltre 900.000 LINE, che costituiscono all'incirca il 21% dell'intero genoma. Le LINE sono spesso utilizzate dai genetisti per il fingerprintig.

Le SINE sono brevi sequenze di DNA (di meno di 500 coppie di basi). Le SINE raramente sono trascritte, e non codificano per la trascrittasi inversa; hanno perciò bisogno delle proteine codificate da altre sequenze (come le LINE) per trasportare. Le SINE più comuni nei primati (e dunque anche nell'uomo) appartengono alla famiglia delle sequenze Alu. Gli elementi di questa famiglia genica sono lunghi circa 300 coppie di basi, e possono essere individuate dal fatto che sono capaci di legare l'enzima Alu I (da cui il nome). Presenti nel genoma umano in oltre 1 milione di copie, le SINE costituiscono all'incirca l'11% del patrimonio genetico totale. Sebbene solitamente classificate come DNA spazzatura, ricerche recenti hanno suggerito che le LINE e le SINE possano sia aver avuto un ruolo importante nell'evoluzione dei genomi, sia avere significanti effetti a livello strutturale e trascrizionale.

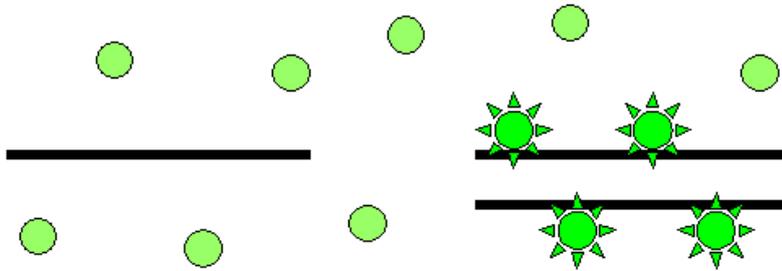
## **Real Time PCR**

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica che permette di amplificare sequenze di DNA in maniera logaritmica. Una coppia di primer (sequenze generalmente lunghe 20bp) si appaia alla doppia elica, ognuno su un filamento, in corrispondenza di una sequenza complementare. L'enzima DNA polimerasi amplifica la sequenza tra i due primer e ad ogni ciclo si ha un aumento esponenziale del numero di sequenze. Dopo diversi cicli (30-40) il prodotto PCR è analizzabile in un gel di agarosio al 1%. La quantità di DNA è tale da permettere una colorazione con etidio bromuro. Il quale legandosi alla doppia elica di DNA per interpolazione tra le basi è reso fluorescente quando irradiato da raggi UV. Con questa procedura si ottiene una valutazione qualitativa ma non quantitativa. Se abbiamo interesse a sapere il numero di copie iniziale del frammento che desideriamo amplificare con una specifica coppia di primer, abbiamo bisogno della tecnica della PCR Real-Time. Uno strumento che ad ogni ciclo è in grado di verificare il numero di copie presenti nella reazione di PCR.

Questo genere di analisi è fondamentale per analisi OGM. Ovvero per verificare se, e in quale percentuale, è presente un gene esogeno.

Se invece il nostro scopo è verificare l'espressione di un determinato gene, allora la nostra analisi non verrà fatta su DNA ma su cDNA. Il cDNA si ottiene dall'mRNA attraverso una trascrittasi inversa che genera un singolo filamento di DNA partendo dall'mRNA. In questo modo usando il cDNA è come se amplificassimo l'mRNA. L'amplificazione quindi dipenderà dal numero di copie dell'mRNA e quindi dal livello di espressione del gene.

Esistono diverse tecniche di Real-Time PCR, tutte fanno uso di cromofori che emettono luminescenza durante l'amplificazione. Noi ci soffermeremo sulla tecnica del syber green usata in questa tesi (Fig. 1.7). Come l'etidio bromuro emana fluorescenza ma è più sensibile e luminoso. Esso lega il doppio filamento di DNA ma non il singolo filamento. Uno speciale strumento calcola ad ogni ciclo la luminescenza che di fatto rappresenta il numero di amplificati presenti nella reazione di PCR.



**Figura 1.7** Rappresentazione del funzionamento della sonda Syber green

### **Descrizione della tecnica di Real time**

Per evitare artefatti è necessario avere un standard interno o gene referente, il quale dovrebbe avere alcune caratteristiche:

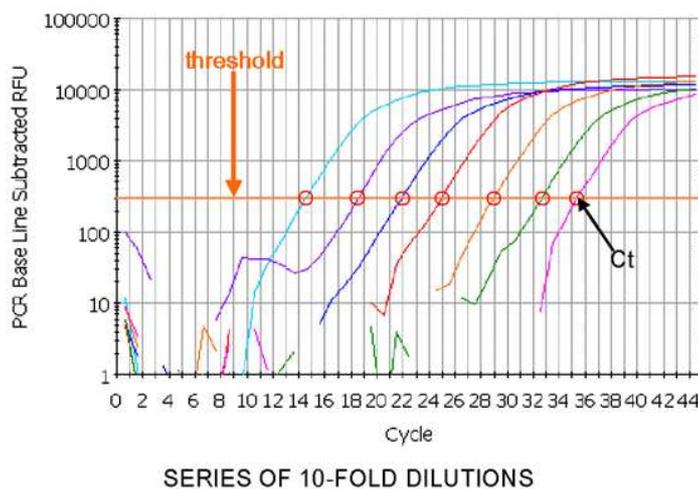
- Dovrebbe avere lo stesso numero di copie in tutte le cellule
- Dovrebbe essere espresso in tutte le cellule

Lo standard perfetto non esiste, dipende molto dal tipo di analisi effettuate, comunque quelli più comuni sono:

- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA

- Beta actin mRNA
- MHC I (major histocompatibility complex I) mRNA
- Cyclophilin mRNA
- m RNAs for certain ribosomal proteins e.g. RPLP0 (ribosomal protein, large, P0). This is also known as 36B4, P0, L10E, RPPO, PRLP0, 60S acidic ribosomal protein P0, ribosomal protein L10, Arbp or acidic ribosomal phosphoprotein P0.
- 28S or 18S rRNAs (ribosomal RNAs)

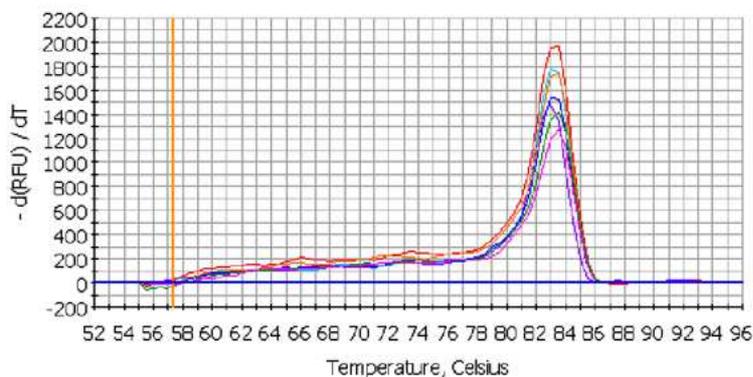
quindi come si misura la differente concentrazione di cDNA? In figura 1.8 è mostrata una serie di campioni ognuno diluito 10 volte rispetto al precedente. Ogni diluizione obbliga il campione ad un maggior numero di cicli prima che l'amplificazione sia percepibile.



**Figura 1.8** Immagine rappresentante i diversi Ct per lo stesso amplificato con diluizione di 10 volte

Possiamo notare come le reazioni siano abbastanza variabili nella parte alta della curva. Per questo motivo la quantificazione del cDNA deve essere fatta quando l'amplificazione è in fase logaritmica. Nella real Time per quantificare la quantità di cDNA iniziale, si misurano il numero di cicli al quale l'incremento della fluorescenza è logaritmica, nella foto indicata dalla linea arancione (chiamata linea di threshold). Il punto in cui la fluorescenza incrocia la linea di threshold è chiamato Ct.

Il syber green si lega specificamente al doppio filamento di DNA. Siamo sicuri che la fluorescenza prodotta durante i cicli di PCR sia dovuta esclusivamente al frammento che vogliamo amplificare? Un modo per verificarlo è di calcolare la temperatura di melting, cioè la temperatura alla quale la doppia elica si denatura e torna a singolo filamento. Essa dipende dalla composizione di base e dalla lunghezza del filamento (se è corto). Quindi alla una volta terminata la Real Time PCR, la macchina, programmata per la curva di melting, aumenterà la temperatura fino a 95°C. Al punto di melting il doppio filamento si denatura e la fluorescenza diminuirà drasticamente. La figura 1.9 mostra come dovrebbe apparire senza artefatti.



**Figura 1.9** Verifica della temperatura di melting

## Quantificazione dei livelli di mRNA usando la PCR Real Time (metodo Pfaffl 2001)

Il metodo Pfaffl è stato studiato per quantificare l'mRNA senza ritrarre lo strumento ogni volta e in questa tesi di dottorato è stato utilizzato tale metodo.

In primo luogo è importante discutere dell'importanza dell'efficienza. Con una efficienza del 100% otterrei ad ogni ciclo di PCR il raddoppio della quantità la DNA, con una efficienza del 90% quantità del DNA aumenterà di 1,9 volte a ciclo. Come mostra la figura 1.10, si può notare come un cambiamento nella efficienza del 10%, si riflette in una quantità di DNA minore del 25% rispetto alla colonna precedente.

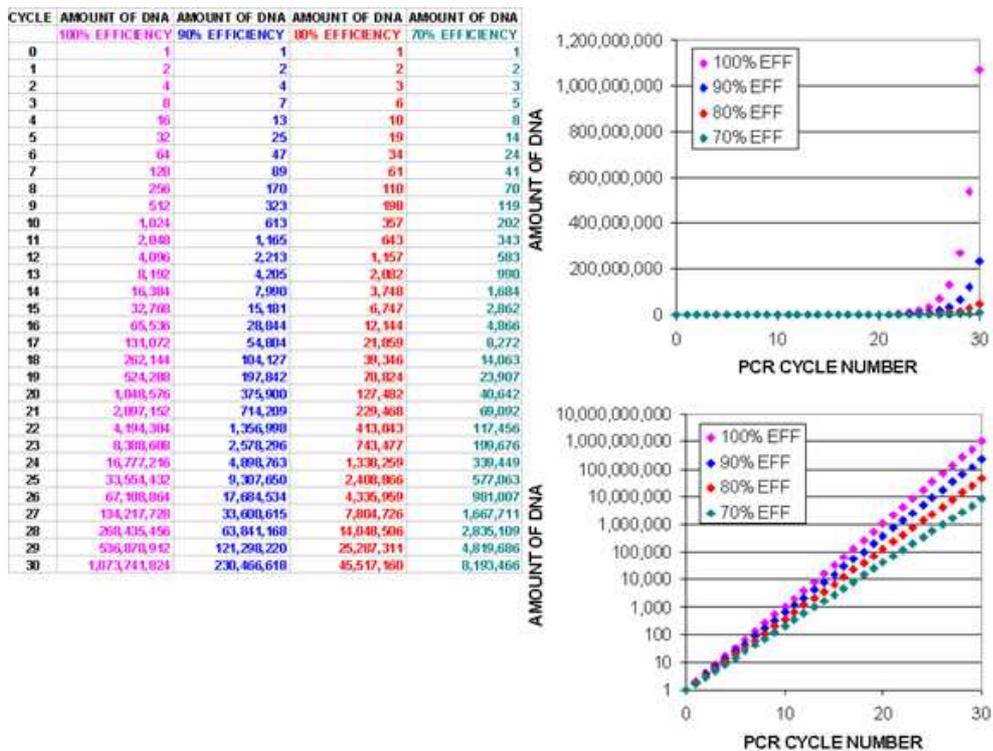


Fig 1.10 Quantità di DNA per ogni ciclo di amplificazione a differenti percentuale di efficienza

L'incremento di DNA dopo 10 cicli è calcolabile con la semplice formula di  $2^{10}$  con efficienza del 100%, se invece fosse del 90% sarebbe  $1,9^{10}$ , in generale dopo n cicli (efficienza)<sup>n</sup>. A questo si può spiegare come funziona il metodo Pfaffl. Dobbiamo verificare il livello di espressione di un gene, che chiameremo gene target. Esso sarà espresso in normale condizioni (controllo) e e in condizioni non normali, ad esempio un mutante (che indichiamo con trattato). Se vi è una differenza di espressione tra controllo e trattato vedremo anche un "Ct" differente. Quindi se il cDNA di partenza è maggiore nel trattato, il suo Ct corrisponderà ad un numero di cicli inferiori rispetto al controllo, il contrario se invece è minore. Calcoleremo quindi un  $\Delta Ct$  sottraendo il trattato dal controllo. Il  $\Delta Ct$  sarà l'esponente dell'efficienza per verificare di quante volte il gene trattato è più/meno espresso rispetto al controllo

$$(\text{Efficienza})^{\Delta Ct}$$

Errori procedurali che abbiano influenzato la quantità di cDNA iniziale potrebbero falsare questo risultato. Esso infatti dovrà essere corretto con il gene referente, che, come abbiamo detto precedentemente, dovrà essere un gene sempre espresso in tutti i tessuti. Verrà eseguita la stessa procedura svolta per calcolare l'incremento/decremento del gene target, si noti però che un buon gene referente non dovrebbe avere un quantitativo di mRNA tanto diverso tra controllo e trattato. La formula finale sarà pertanto:

$$\text{RAPPORTO} = \frac{(\text{Gene target})^{\Delta Ct \text{ target (controllo - trattato)}}}{(\text{Gene referente})^{\Delta Ct \text{ referente (controllo - trattato)}}$$

Con questa formula sono stati calcolate l'espressione di tutti i geni studiati in questa tesi. Si è calcolato quindi il numero di volte fosse più o meno espresso ogni singolo gene in Max Red Bartlett rispetto a William.

## **HPLC**

La cromatografia liquida ad alta prestazione, in inglese High Performance Liquid Chromatography, più semplicemente nota come HPLC è un tipo di cromatografia.

Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10  $\mu\text{m}$ ), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si

vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato.

Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (IR, UV-VIS, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: la dimensione ridotta della colonna che evita problemi di deviazioni longitudinali (movimenti della fase mobile longitudinali) e di percorsi alternativi; velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) costante e regolabile; velocità di esecuzione ridotta; piccole quantità di composto necessaria all'analisi (nell'ordine dei 5-10 microgrammi di campione solubilizzato in apposito solvente) tutto a favore di una maggiore accuratezza e precisione.

Lo svantaggio principale degli apparecchi per HPLC è il costo molto più elevato rispetto ad una cromatografia su colonna tradizionale (circa 20-30 mila euro per uno strumento completo dalle medie prestazioni), anche se non è possibile paragonare le due metodiche poiché presentano campi di applicazione diversi.

Le più importanti tecniche di cromatografia liquida sono:

- ◇ Cromatografia di ripartizione
- ◇ Cromatografia di adsorbimento
- ◇ Cromatografia ionica
- ◇ Cromatografia di esclusione molecolare

Spesso le diverse procedure sono complementari tra loro. Per quanto riguarda i rivelatori, affinché sia idoneo all'uso in HPLC dovrebbe soddisfare le seguenti caratteristiche:

- ◇ Sensibilità adeguata, che ovviamente dipende sia dalle particolari esigenze dell'operatore che dal tipo di campione da analizzare
- ◇ buona stabilità e riproducibilità
- ◇ risposta lineare per più ordini di grandezza
- ◇ tempo di risposta breve
- ◇ elevata facilità d'uso e affidabilità
- ◇ uniformità di risposta nei confronti di tutti gli analiti o al contrario elevata specificità per particolari composti
- ◇ rivelazione non distruttiva
- ◇ piccolo volume interno per evitare allargamento delle bande

I rivelatori più usati sono ad assorbimento UV, vi sono poi i metodi a fluorescenza, sull'indice di rifrazione, la costante dielettrica, rivelatori elettrochimici, a spettrometro di massa ed altri ancora che sono specifici per ottimizzare le misure dei diversi composti analizzabili.

La regione dello spettro più sfruttata nei rivelatori ad assorbanza per HPLC è l'UV, in second'ordine vi è la regione del visibile e in misura ancor minore l'infrarosso. Vengono impiegati sia rivelatori a filtri (fotometri) che a monocromatore (spettrofotometri).

I più semplici fotometri per HPLC usano una lampada a mercurio, di cui si seleziona di solito la banda centrata a 254nm, ma si usano anche le bande a 250, 313, 334, e 365nm. Diversi gruppi funzionali assorbono a queste lunghezze d'onda sia organici che inorganici.

Il loro campo di applicabilità dei rivelatori a infrarosso in HPLC è piuttosto scarso per via dei solventi usati come fase mobile, di solito, acqua o alcoli, che hanno diverse bande di assorbimento nell'IR e rischiano di comprire i segnali degli analiti.

I rivelatori a fluorescenza presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità rispetto ai metodi ad assorbanza, di solito superiore a un ordine di grandezza. Hanno però lo svantaggio di un minore campo di applicabilità, dato che le specie assorbenti è notevolmente superiore rispetto a quelle fluorescenti. Si possono comunque usare rivelatori a fluorescenza anche per analiti non fluorescenti se si riesce a trattarli con reagenti che diano prodotti fluorescenti.

I rivelatori basati sulla variazione dell'indice di rifrazione dovuti alla presenza dei soluti nella fase mobile hanno il grande vantaggio di avere un campo di applicabilità estremamente vasto; sono inoltre molto affidabili e non risentono delle variazioni di flusso. Hanno però scarsa sensibilità, non sono applicabili a eluizioni a gradiente e necessitano di essere termostatati al millesimo di grado centigrado perché le loro prestazioni dipendono fortemente dalla temperatura.

Hanno un ampio campo di applicabilità anche i rivelatori elettrochimici basati sulla conduttimetria, la voltammetria, l'amperometria e la coulombometria.

L'applicabilità dello spettrometro di massa come rivelatore per HPLC è complicata dalla grande quantità di eluito proveniente dalla colonna che mal si

concilia con la necessità del vuoto spinto nelle analisi con spettrometro di massa. Si è quindi dovuto lavorare molto per sviluppare interfacce idonee che eliminassero o riducessero il solvente usato come eluente.

### **Gascromatografia**

La gascromatografia, nota anche come GC, è una tecnica cromatografica impiegata a scopo analitico. Come tutte le cromatografie, si basa sulla diversa ripartizione di diverse sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con la fase mobile, costituita da un gas inerte.

Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi. La GC ha conosciuto il suo grande boom negli anni '60 e tuttora conserva una posizione di primo piano fra le tecniche di separazione di miscele complesse. L'unica grande limitazione della cromatografia in fase gassosa è rappresentata dal fatto che il campione deve essere volatile in un intervallo di temperatura compreso tra la ambiente e i 500°C circa, la temperatura comunemente raggiunta dai forni degli strumenti in commercio e compatibile con le colonne cromatografiche usate. Esiste tuttavia una lunga serie di applicazioni (a cominciare dall'analisi dei composti di per sé volatili e dei gas) che rendono molto utile la presenza del gascromatografo in ogni laboratorio di analisi.

I meccanismi di separazione che si sfruttano in gascromatografia sono sostanzialmente due:

- ◇ adsorbimento: la fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire una serie di legami secondari (dipolo-

dipolo, ponte idrogeno, Van der Waals, dipolo-dipolo indotto, ecc.) con le diverse molecole della miscela da risolvere, si parla perciò di cromatografia gas-solido (GSC, gas-solid chromatography).

- ◇ ripartizione: se la fase stazionaria è liquida si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze nella fase stazionaria che si ripartiscono tra le due fasi immiscibili. Si parla di cromatografia gas-liquido (GLC gas-liquid chromatography).

La fase stazionaria è generalmente costituita da un liquido non volatile supportato su una polvere che riempie uniformemente una colonna ("colonna impaccata") oppure distribuito come film sottile spesso qualche micrometro sulla parete interna di una colonna di lunghezza superiore ai 10 metri e di diametro inferiore al millimetro ("colonna capillare"). Tale liquido può variare a seconda dell'applicazione, ossia del tipo di composti che si intendono analizzare.

La fase mobile è un gas, detto anche gas di trasporto, gas vettore o gas carrier. Generalmente, vengono scelti gas chimicamente inerti, a bassa viscosità ed ottenibili ad elevata purezza quali l'azoto, l'elio o l'argon; per alcune applicazioni vengono anche utilizzati l'idrogeno o l'anidride carbonica.

Il campione, posto in testa alla colonna e sottoposto al flusso costante del gas di trasporto, viene separato nelle sue componenti in funzione di quanto queste siano affini (di solito per polarità) alla fase fissa; un'ulteriore variabile su cui si agisce spesso per migliorare la separazione è la temperatura della colonna, che può essere tenuta costante ("isoterma") o fatta variare secondo un gradiente desiderato.

Quando il campione esce dall'estremità finale della colonna (si dice che è stato eluito) viene raccolto da un rivelatore. Il diagramma che rappresenta il segnale generato dal rivelatore in funzione del tempo (fissato a zero l'istante in cui il campione è stato immesso nella colonna) è il cromatogramma del campione. Il cromatogramma si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza ed altezza distribuiti lungo l'asse del tempo.

Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile dedurre le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato, a seconda del rivelatore impiegato.

### **Rivelatori**

Ve ne sono di diversi tipi, in funzione del principio fisico utilizzato per rilevare l'uscita delle sostanze dalla colonna.

Le due classi più comuni sono quelle dei rivelatori a conducibilità termica e dei rivelatori a ionizzazione di fiamma (o FID).

Un rivelatore a conducibilità termica è costituito da due filamenti riscaldati elettricamente e mantenuti a temperatura costante. Su uno scorre il gas di trasporto puro, sull'altro scorre il gas in uscita dalla colonna. Quando una sostanza viene eluita, il secondo filamento subirà un raffreddamento o un riscaldamento rispetto al primo per via del calore più o meno facilmente asportato dal gas contenente la sostanza eluita. Tale variazione di temperatura si riflette in una variazione di resistenza, che viene amplificata e rappresenta il segnale del detector.

In un rivelatore a ionizzazione di fiamma il gas di trasporto in uscita dalla colonna viene mescolato a idrogeno (o ad azoto, se l'idrogeno è il gas di trasporto) e bruciato. Nella fiamma, quando una sostanza viene eluita, si producono ioni che vengono raccolti sulla superficie del detector producendo una corrente elettrica che, amplificata, rappresenta il segnale del detector. Nonostante il suo essere cieco a tutte le sostanze che non bruciano (ad esempio, l'acqua), il FID è uno dei detector più diffusi.

Altri tipi di rivelatori sono quelli a raggi  $\beta$  e a cattura elettronica, questi ultimi preferiti per l'analisi di composti contenenti atomi elettronegativi. Infine, all'uscita di una colonna cromatografica si può porre uno spettrometro di massa, per avere indicazioni sulla struttura di ogni sostanza eluita.

### **Spettrometria di massa**

La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gascromatografia e la cromatografia in fase liquida (HPLC), o, più recentemente, con tecniche ionizzanti quali il plasma a induzione.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica.

Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto.

### **Introduzione del campione**

Gli spettrometri di massa operano in condizioni di alto vuoto a seconda della sezione dello strumento considerata:  $10^{-4}$  mmHg nella sezione di ionizzazione (fanno eccezione i sistemi di ionizzazione a pressione atmosferica (i.d. APCI) e a plasma ICP);  $10^{-8}$  mmHg nel sistema di analizzazione (separazione degli ioni) e nel sistema di rivelazione. Tutto ciò è necessario per poter ottenere uno spettro con buona risoluzione in quanto l'analizzatore dello spettrometro di massa separa in base alla quantità di moto. La presenza di eventuali molecole di gas atmosferico, infatti, potrebbero interferire con gli ioni, variandone l'energia cinetica e peggiorando il rapporto segnale/rumore.

L'analita viene introdotto nello strumento in ragione di pochi microgrammi.

In queste condizioni la maggior parte degli analiti è in fase gassosa; i solidi che non sublimano verranno invece vaporizzati inserendoli accanto al filamento di ionizzazione. Se lo strumento è collegato in uscita ad una colonna cromatografica, come è ormai prassi in molti casi, il campione entra nello strumento al termine dell'eluizione o direttamente in fase gassosa o tramite un dispositivo di vaporizzazione immediatamente a valle della colonna.

Esistono differenti tipi di sorgente quali:

- EI (Impatto elettronico)
- CI ( Impatto chimico)
- FAB
- ELECTROSPRAY
- MALDI

### **Ionizzazione ad impatto**

Il campione, gassoso o vaporizzato, transita in una apposita *camera di ionizzazione* in cui incrocia perpendicolarmente un flusso di elettroni generati da un filamento incandescente di tungsteno o di renio. L'impatto degli elettroni con le molecole dell'analita produce una miscela di ioni positivi che iniziano ad essere accelerati verso la camera di separazione da un campo elettrico opportunamente tarato. Modulando l'energia del flusso di elettroni è possibile modificare la composizione della miscela di ioni prodotta dall'impatto: fino a circa 14 eV, l'energia degli elettroni è sufficiente per ionizzare la molecola senza provocarne un'ulteriore decomposizione, questo consente di determinare con migliore precisione il peso molecolare; con energie superiori, fino a 80 eV, lo ione molecolare subisce frammentazione secondo meccanismi legati alla sua struttura chimica, lo spettro dei frammenti prodotti aiuta a desumere la struttura della molecola.

Questa tecnica di ionizzazione è la più diffusa in quanto adatta alla maggior parte delle applicazioni.

### **Ionizzazione di campo**

Più adatta a prodotti poco volatili, consiste nel porre il campione su un anodo di metallo o di grafite che viene sottoposto ad un intensissimo campo elettrico ( $10^8$  V/cm). Dalle molecole poste sull'anodo viene estratto un elettrone, lo ione molecolare formatosi si allontana in direzione di una fessura di uscita che funge da catodo. In alternativa al campo elettrico, la ionizzazione è ottenibile anche con un raggio laser focalizzato sul campione (*matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI*).

### **Ionizzazione chimica**

Consiste nello ionizzare per impatto elettronico una quantità di metano, formando ioni che vanno poi a urtare con le molecole del campione, ionizzandole a loro volta o per sottrazione di un elettrone o per cessione di uno ione  $H^+$  - specialmente se l'analita contiene atomi "basici" come nel caso delle ammine o degli eteri. Come la tecnica precedente, è considerata una modalità *soft* di ionizzazione che produce miscele ricche di molecole ionizzate integre.

### **Ionizzazione al plasma**

Gli ioni vengono prodotti introducendo il campione vaporizzato in una torcia di plasma a induzione, generalmente prodotto con argon ad elevata purezza. Questo tipo di ionizzazione, unito ad un analizzatore ad elevata sensibilità, è quello che offre oggi le migliori prestazioni in termini di sensibilità dello strumento; è possibile rintracciare elementi in concentrazioni fino a poche parti per miliardo (ppb).

## **Ionizzazione**

L'analita può venire ionizzato secondo varie tecniche: l'espulsione di elettroni, la protonazione, la deprotonazione, la cationizzazione. Con l'espulsione di elettroni si genera uno ione-radicalo, specie molto instabile che può subire facilmente frammentazione, mentre con la protonazione e deprotonazione si genera uno ione pseudomolecolare. La massa del composto è semplice da rilevare a partire dal rapporto  $m/z$  perché nella maggior parte dei casi la carica dello ione è unitaria.

## **Separazione degli ioni**

Qualunque sia il metodo impiegato per ionizzare il campione, il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore, cioè in un dispositivo capace di separare gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ), in maniera analoga a come un monocromatore separa le diverse lunghezze d'onda in spettrofotometria.

Esistono diversi tipi di analizzatore, classificati in funzione del loro principio di funzionamento

- Analizzatore magnetico
- Analizzatore a quadrupolo
- Analizzatore a trappola ionica
- Analizzatore TOF

### **Campo magnetico statico**

La differenza di potenziale alle estremità della camera di ionizzazione (potenziale di accelerazione)  $V$  impartisce agli ioni in uscita dalla camera un'energia cinetica

$$\frac{1}{2}mv^2 = eV$$

L'analizzatore è immerso in un campo magnetico di intensità  $H$ , sugli ioni in corsa agisce quindi una forza

$$F = Hev$$

che cambia la loro traiettoria in una curva di raggio  $r$  tale per cui

Campo elettrico oscillante (o "*quadrupolo*")

È un analizzatore ideato da Wolfgang Paul, per il quale vinse il premio Nobel *ex-aequo* per la fisica nel 1989

Il flusso di ioni attraversa uno spazio a sezione quadrata al centro di quattro barre orizzontali parallele alle cui coppie diagonalmente opposte vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fisso, unito ad un altro oscillante con frequenze dell'ordine delle onde radio, fa muovere gli ioni secondo traiettorie sinusoidali consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. La modulazione del segnale radio consente di scandire l'intero arco delle masse corrispondenti.

Gli strumenti con questo tipo di separatore risultano essere più compatti nelle dimensioni e generalmente meno costosi di quelli basati sul campo magnetico statico.

### **Tempo di volo (o time-of-flight, TOF)**

L'energia cinetica degli ioni creati nella camera di ionizzazione dipende dal potenziale di accelerazione; questo significa che gli ioni, lasciati liberi di muoversi su una traiettoria rettilinea in assenza di altri campi elettrici o magnetici, si muovono con velocità diverse in funzione della loro massa

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}}$$

per un analizzatore di data lunghezza si ha quindi che il *tempo di volo*, cioè il tempo impiegato da uno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore,  $t$  è

$$t = k\sqrt{\frac{m}{e}}$$

in cui  $k$  è una costante tipica dello strumento.

Il valore di  $t$  è generalmente dell'ordine di pochi (5 - 20) microsecondi. È chiaro che se gli ioni entrano nell'analizzatore a tempo di volo in continuazione, come nel caso degli analizzatori precedenti, è impossibile ottenere una loro separazione. La miscela di ioni deve essere quindi suddivisa in una serie di brevissimi impulsi agendo sul potenziale di accelerazione.

### **Rivelatori**

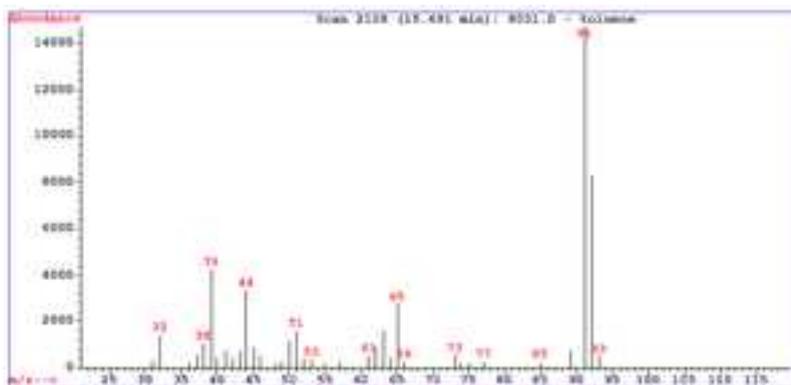
Si tratta generalmente di *dinodi*, cioè moltiplicatori elettronici capaci di amplificare la debolissima corrente prodotta dagli ioni che hanno superato l'analizzatore. I segnali ottenuti in questo modo vengono poi trasmessi ad un calcolatore in grado, con l'opportuno software, di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, cioè lo spettro di massa finale. L'uso

dei calcolatori permette inoltre di combinare rapidamente la gestione dei parametri dello strumento con la ricerca bibliografica in librerie di spettri in formato elettronico, in modo da automatizzare l'identificazione dei composti in base al loro spettro ed alle condizioni operative in cui è stata condotta l'analisi. combinando le tre equazioni si ottiene la relazione tra il raggio di curvatura e la massa dello ione:

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

Normalmente  $H$  e  $r$  dipendono dal tipo e dalle dimensioni del magnete usato e sono quindi mantenuti statici, ciò significa che ad ogni valore del potenziale di accelerazione  $V$  solo gli ioni di una data massa  $m$  (trascuriamo le ionizzazioni multiple) andranno a collidere col rivelatore. Nella pratica,  $V$  viene fatto variare in un intervallo di valori tale da coprire il corrispondente intervallo di  $m$  (corrente ionica totale o *total ion current*, *TIC*). Per misure ad alta sensibilità atte a rilevare la presenza di uno ione ben preciso è anche possibile fissare il valore di  $V$  sul valore corrispondente alla massa desiderata (monitoraggio del singolo ione o *selected ion monitoring*, *SIM*).

## Cenni minimi all'interpretazione di uno spettro



**Fig 1.11** Spettro di massa del toluene; il picco base è il 91, il picco genitore è il 92

### Picco genitore

In applicazioni di routine, gli spettri vengono normalmente rappresentati come istogrammi che riportano l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, ipotizzando ragionevolmente che tutti gli ioni prodotti dall'analisi abbiano carica singola. Le abbondanze vengono riportate come rapporto rispetto al picco base, che è il picco più abbondante osservato nello spettro. Tale normalizzazione permette di avere spettri che sono funzione solamente dell'analita e delle condizioni di analisi. Il picco base non sempre coincide con il picco genitore, che è invece il picco che corrisponde alla molecola ionizzata e che consente di stabilire quindi il peso molecolare dell'analita. In genere, più uno ione molecolare è stabilizzato (per effetto induttivo o per risonanza), maggiore è la sua probabilità di giungere intatto al rivelatore, maggiore quindi sarà la sua abbondanza. Dall'abbondanza del *picco genitore* è possibile già ipotizzare a quale classe di composti appartenga l'analita. Nel caso della ionizzazione da impatto a medie energie si ha:

- ◇ dallo 0 al 10% circa: alcani lineari, alogenuri alchilici, esteri, alcoli, acidi carbossilici
- ◇ dal 10% al 50% circa: alcheni, polieni coniugati, aldeidi, chetoni, eteri
- ◇ dal 50% circa al 100%: composti aromatici, cicloalcani, mercaptani

Qualora si desideri aumentare l'abbondanza del picco genitore, occorre o ridurre l'energia impiegata nella ionizzazione da impatto o ricorrere a tecniche di ionizzazione più soft quali la ionizzazione chimica o di campo.

### **Effetti isotopici**

Il numero di picchi osservati in uno spettro di massa è sempre maggiore di quello dei frammenti prodotti dall'analisi, questo perché ogni picco è accompagnato da picchi satellite, prodotti da ioni contenenti isotopi minoritari dei vari elementi. Dato che i rapporti medi tra le diverse quantità di isotopi di uno stesso elemento in natura sono noti e sostanzialmente costanti, dall'abbondanza dei picchi satellite è possibile ricavare informazioni che consentono di ipotizzare la formula bruta dell'analita.

Un esempio particolarmente eclatante di questo effetto riguarda il cloro ed il bromo, la cui presenza nello spettro è immediatamente evidente:

Il cloro è presente in natura con due isotopi  $^{35}\text{Cl}$ , 75% circa, e  $^{37}\text{Cl}$ , 25% circa. Questo fa sì che gli ioni contenenti un atomo di cloro producano due picchi, uno a peso molecolare  $M$  ed uno a peso molecolare  $M+2$  in rapporto 3:1.

Il bromo è presente in natura con due isotopi  $^{79}\text{Br}$ , 51% circa, e  $^{81}\text{Br}$ , 49% circa. Questo fa sì che gli ioni contenenti un atomo di bromo producano due

picchi, uno a peso molecolare  $M$  ed uno a peso molecolare  $M+2$  in rapporto circa 1:1.

Un effetto meno marcato è prodotto anche dal carbonio, dato che  $^{13}\text{C}$  ha un'abbondanza in natura dell'1% circa.

Esistono in letteratura tabelle (le tabelle di Beynon) che mettono in correlazione le distribuzioni dei picchi satellite con la formula bruta di un composto, inoltre tali funzioni sono ormai integrate nei software di analisi ed interpretazione degli spettri di massa.

### **Frammentazioni**

Il picco genitore è quello prodotto dalla molecola dell'analita ionizzata; avendo perso un elettrone, la molecola è diventata un radicale-ione che, instabile, si decompone in frammenti che sono radicali e ioni. I primi, essendo neutri, non giungono al rivelatore, ma la loro massa può essere dedotta per differenza tra il peso molecolare del picco genitore e quello dei frammenti ionici. Gli ioni sono anch'essi stabilizzati per effetto induttivo e per risonanza, pertanto la presenza nello spettro di ioni di pesi molecolari tipici è rivelatrice

## **Scopi della Tesi**

L'ereditarietà del carattere "colore rosso" della buccia della pera è intuitivamente comprensibile dall'osservazione in campo di popolazioni di pera segreganti per il colore rosso dell'epicarpo. In particolare dall'incrocio tra Abate Fetel (cultivar gialla) x Max Red Bartlett (cultivar rossa) il 50% dei semenzali presentava una colorazione rossa mentre il restante 50% giallo. Questo carattere "colore rosso" avendo una segregazione di tipo mendeliano è stato considerato come marcatore morfologico e come tale mappabile in una mappa molecolare ottenuta in lavori precedente (Pierantoni et al. 2004 e 2006).

Un elemento di originalità deriva però dal fatto che Max Red Bartlett è una mutazione della cultivar gialla William. Quindi avere due genotipi identici e compatibili, differenti solo per questo carattere di interesse, costituiva una grande occasione per comprendere meglio la regolazione della via biosintetica dei pigmenti antocianici responsabili della pigmentazione rossa nella buccia dei frutti di pera.

A questo scopo si è scelto un approccio multi-disciplinare che integrasse le conoscenze pregresse a livello genomico con uno studio nuovo a livello proteomico.

Le analisi sono state condotte su William e Max Red Bartlett utilizzando la tecnica della SDS-PAGE bi-dimensionale su frutti raccolti nella prima decade di agosto, a maturazione commerciale. La complessità dei pattern proteici ottenuti con i primi approcci proteomici ha evidenziato come la problematica affrontata possa essere più articolata di quanto ipotizzata in un primo momento. Per questo si è quindi deciso di seguire una nuova via che integrasse l'approccio con geni candidati e le analisi di espressione dei geni che della via

biosintetica delle antocianine presumibilmente diversamente regolati nel mutante rosso di William.

Innanzitutto in banca dati sono riportate le sequenze di melo dei putativi geni candidati, sulle quali è possibile disegnare primer che amplifichino su DNA genomico di pero. Si tratta quindi di un approccio con geni candidati da sviluppare sui putativi geni CHS, CHI, F3H, DFR, ANS (o LDoX), UFGT e un gene regolatore della trascrizione della famiglia Myb. Tali marcatori possono essere utilizzati sia per il mappaggio sulla popolazione AF x MRB sia per una successiva analisi di espressione.

Per osservare come varia l'espressione dei geni della via biosintetica delle antocianine è necessario scegliere i campioni in diverse fasi di maturazione dei frutti: il primo a 45gg dalla piena fioritura, poi a 60, 90 e 120 giorni, utilizzando per le analisi una di Real Time PCR.

Per concludere entrambe le varietà devono essere fenotipizzate allo scopo di individuare differenze sia nei composti flavonoidici sia, eventualmente, nella composizione zuccherina e nei composti volatili. Tali analisi condotte con LC-MS e GC-MS. dovranno individuare i composti antocianici presenti in Max Red Bartlett e assenti in William, oltre ad una serie di composti zuccherini e volatili presenti in entrambe le varietà, confermando, in questo caso, che la mutazione agisce solo a livello del carattere rosso della buccia senza interferire in altri aspetti qualitativi.

## **MATERIALE E METODI**

## **Materiale Vegetale**

Per tutti i campionamenti sia di foglie che di frutti sono state usate piante della cultivar ‘William’ e ‘Max Red Bartlett’ innestate su franco ed allevate presso i campi della stazione sperimentale del Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna, in località Cadriano.

In questa tesi si è usato anche la popolazione derivata dall’incrocio ‘Abate Fetèl’ x ‘Max Red Bartlett’ (95 semenzali). In particolare si è usufruito delle mappe molecolari costruite su questo incrocio con marcatori molecolari (Pierantoni e Dondini et al. 2006) per la ricerca di eventuali polimorfismi tra i geni putativi coinvolti nella sintesi di pigmenti colorati nelle foglie e nei frutti.

## **Misurazione del colore**

Le misurazioni per il reale colore dei frutti è stato eseguito con il colorimetro Minolta CR300. Le misure sono state effettuate su 4 campionamenti, corrispondenti alle date di 45 giorni dopo la piena fioritura, 60 gg, 90gg e 120gg. I frutti sono stati raccolti direttamente in campo e successivamente sono state fatte le misurazioni. Ogni misurazione è stata ripetuta su dieci frutti. Su ogni frutto sono state fatte tre misure. Lo spazio di colore  $L^* a^* b^*$  consiste di una componente luminosa ( $L^*$ ) e da due componenti cromatiche: la  $a^*$  dal verde (-a) al rosso (+a) e la  $b^*$  dal blu (-b) fino al giallo (+b). il colorimetro è stato calibrato usando come standard una superficie bianca. I valori dello standard per il bianco sono  $L = 97.10$ ,  $a = +0.13$ ,  $b = +1.88$ . Le differenti combinazione dei parametri  $a^*$  e  $b^*$  vengono impiegate per la determinazione

del Cromo (che rappresenta l'intensità del colore ed indica la percentuale di colore puro presente) e della Tinta ( che indica la tonalità del colore).

$$C (\text{Croma}) = ( a^{*2} + b^{*2} )^{1/2}$$

$$H (\text{Tinta}) = \text{Arctg} ( b^* / a^* )$$

## **Estrazione e purificazione del DNA**

Il DNA è stato estratto a partire da campioni di foglie fresche: per ciascuna delle due cultivar (William e Max Red Bartlett) sono state raccolte in campo le foglie giovani della parte apicale del germoglio. Le foglie sono state congelate per immersione in azoto liquido immediatamente dopo la raccolta e conservate alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'estrazione.

Il metodo utilizzato per l'estrazione si basa sull'utilizzo del detergente CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio) che in presenza di elevate concentrazioni saline si lega al DNA formando un complesso stabile e solubile in acqua. Per ogni estrazione si è utilizzato un campione di 0,1 g di foglie fresche.

1. macinare in azoto liquido in mortai di ceramica
2. trasferire il macinato in un tubo da 2 ml e aggiungere il buffer di estrazione pre-riscaldato (tab 3.1). Tenere in incubazione a  $60^{\circ}\text{C}$  per 20 minuti
3. aggiungere un uguale volume di diclorometano/alcol isoamilico (24:1). Agitare per 10 minuti
4. centrifugare a 3800 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente
5. trasferire il surnatante in un tubo nuovo.
6. aggiungere 10 $\mu\text{l}$  di Rnasi ed incubare a  $37^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti
7. ripetere dal punto 3
8. addizionare 0.6 volumi di isopropanolo freddo. Condensare il DNA per inversione del tubo
9. centrifugare per 5 minuti a 5000 rpm

10. lavare il pellet con etanolo 80%
11. centrifugare ed eliminare l'etanolo. Seccare il pellet.
12. risospingere il pellet in 300µl TE. Una volta che il pellet è ben disciolto aggiungere 200µl di NaCl 5M e precipitare in 2 volumi con etanolo 100%
13. recuperare il DNA per centrifugazione.
14. una volta seccato il pellet si ri-sospende in acqua sterile

**Tab. 3.1** reagenti per tamponi di estrazione

---

**TAMPONE DI ESTRAZIONE – CTAB**

---

CTAB 2% (Sigma)

NaCl 1.4 M

EDTA 20 mM

Tris (pH8) 100 mM

PVP-40 2%

β-Mercaptoetanol 1%

---

**TAMPONE TE**

---

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

---

Per ogni campione 1µl di soluzione di DNA è stata misurata con lo spettrofotometro NanoDrop ND- 1000 UV-Vis. Lo strumento fornisce direttamente la concentrazione del campione, espressa in ng/ul, e i rapporti di assorbanza: 260/230nm e 260/280nm che permettono di stimare la purezza del DNA (da vari contaminanti quali proteine, polisaccaridi e fenoli).

## **Marcatori funzionali per la via biosintetica del colore**

Il DNA estratto dai due genotipi William e Max Red Bartlett è stato amplificato con primer specifici. Sulla base delle sequenze di pero e melo, sono stati disegnati diverse coppie di primer per i geni coinvolti nella via biosintetica delle antocianine.

### **Primer usati**

CHS (*calcone sintasi*)

For: agaacaccagttcgggaaca

Rev: acacttgccttgctgcttct

CHI (*calcone isomerasi*)

For: tca aag cct ctt aac gca a

Rev: ctt tga tcc agg cga aac a

F3H (*flavone 3-idrossilasi*)

For: aaa gat ggg ttt tac ggg agt c

Rev: gat cag cat ttt gaa cct ccct

DFR (*Diidroflavon\_reduktasi*)

For: ctc agg ctt agg caa aca cag t

Rev: ccc aca aac atg tcc tcc aag

ANS (LDoX) (*Antocianidin sintasi*)

For: ctt aga gtt ggt aag gtt ttc

Rev: agg atg aag gtg agt gca cac

UFGT (*UDP-Glucosio: flavonol glucosiltransferasi*)

For: cat taa agg ccg tac gat gaa

Rev: cta caa atc atg ggc acc cct c

Myb (*MyeloBlastosis*)

For: cgc acg gtg aca ata gag tta

Rev: tga aat ctt gcc caa ctt caa g

Le sequenze ottenute sono elencate nell'allegato A. Il protocollo di amplificazione usato per le PCR è uguale per tutti i geni (Tab 3.3).

**Tab 3.2** Miscela di amplificazione dei geni funzionali

Miscela di reazione pcr	Volume di soluzione di lavoro
Acqua	13.625 µl
Tampone 10X	1.75 µl
MgCl <sub>2</sub>	0.6 µl
dNTP 10mM	0.175 µl
Primer for	0.175 µl
Primer rev	0.175 µl
Taq polimerasi 5U/µl	0.1 µl
DNA 50µg/ml	1 µl

**Tab. 3.3** Protocollo di amplificazione dei geni funzionali.

	Temperatura	Tempo	N° Cicli
Denaturazione	94°C	2'30''	1
Appaiamento	55-60°C	45''	
Estensione	72°C	1'	33
Estensione	72°C	9'	

## **Clonaggio e sequenziamento dei geni putativi**

### **Preparazione di cellule competenti:**

Per ottenere cellule competenti per la trasformazione si è utilizzato il ceppo DH5 $\alpha$  di *E. coli*. Si tratta di un ceppo privo di plasmidi e quindi di resistenze che potrebbero interferire nella fase di selezione delle cellule trasformate.

- Mettere in crescita a 37°C overnight le cellule batteriche in mezzo liquido LB (vedi tabella 3.6)
- Traferire 1 ml della coltura batterica in 100 ml di mezzo 2XYT (vedi tabella 3.6);
- Incubare a 37°C in vigorosa agitazione per alcune ore, fino a quando l'assorbanza ad un'emissione di fluorescenza di 550 nm non è di 0.6 OD (densità ottica).
- Dopo l'incubazione raffreddare le cellule in ghiaccio per 10 minuti.
- Prelevare due aliquote di 20 ml in tubi sterili da 50 ml.
- Centrifugare per 10 minuti a 8000 rpm a 4°C.
- Risospendere in 10 ml di cloruro di calcio 100 mM sterile e raffreddato a 4°C.
- Incubare in ghiaccio per circa 20 minuti.
- Ripetere una centrifugazione e risospendere delicatamente i precipitati in 2 ml di cloruro di calcio 100mM con il 14% di glicerolo.

Le cellule rese in questo modo competenti sono state suddivise in aliquote di 0.2 ml in provette di 1.5 ml e conservate a -80°C.

**Tab. 3.4** Protocollo ligasi e mix di reazione

<b>PROTOCOLLO LIGASI</b>	
Tampone T4 DNA ligasi	5 $\mu$ l
Plasmide pGEM	1 $\mu$ l
Prodotto PCR	3 $\mu$ l
T4 DNA ligasi	1 $\mu$ l
<b>TAMPONE T4 DNA LIGASI 10X</b>	
Tampone Tris HCl pH 7.8	300 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM

#### **Preparazione del plasmide ricombinante:**

Per il clonaggio delle sequenze geniche è stato utilizzato il kit “pGEM-T Vector System” della Promega. Per la reazione di ligazione è stato seguito il protocollo fornito dalla ditta produttrice (vedi tabella 3.4). La miscela è stata messa in incubazione a 4°C per una notte.

#### **Preparazione delle piastre:**

- Aggiungere 15 g di agar ad 1 litro di mezzo liquido LB (tabella 3.6) ed autoclavare.
- Raffreddare a 50°C e aggiungere 50 $\mu$ g di ampicillina (1 ml di soluzione a 50mg/ml). E' importante che la temperatura non superi i 50°C per evitare che l'antibiotico si denaturi e perda la sua funzionalità.
- Versare in piastre Petri e lasciare solidificare. Conservare a 4°C.

Al momento dell'uso si sono aggiunti ad ogni piastra 40  $\mu$ l di una soluzione di X-Gal e 4  $\mu$ l di una soluzione di IPTG (tabella 3.5).

**Tab 3.5** Soluzioni per X-Gal e IPTG

<b>SOLUZIONE X- Gal</b>	
X-Gal	40 mg
N,N'dimetilformamide	2 ml

<b>SOLUZIONE IPTG</b>	
IPTG	1.2 g
Acqua	50 ml

**Trasformazione:**

la fase di trasformazione consiste nell'introdurre i plasmidi, in cui è stato inserito il DNA di interesse, nelle cellule competenti:

- In un tubo da 2 ml si sono mescolare 0.1 ml della sospensione di cellule competenti con 2  $\mu$ l della miscela di legazione
- incubare per 30 minuti in ghiaccio.
- Immergere per 45 secondi in un bagno termostatico a 42°C e immediatamente dopo in ghiaccio per un 2 minuti.
- Aggiungere 900  $\mu$ l di mezzo SOC (tabella 3.6) e incubare 1 ora a 37°C
- Stendere 100  $\mu$ l di ogni sospensione cellulare sulle piastre e incubare a 37°C overnight.

**Tab 3.6** soluzioni per il clonaggio

<b>MEZZO LB (1 litro)</b>	
Bacto-Tryptone	10 g
Bacto-Yeast extract	0.5 g
NaCl	5 g
<b>MEZZO 2XYT (i litro)</b>	
Bacto-Tryptone	16 g
Bacto-Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
<b>MEZZO SOC</b>	
Bacto-Tryptone	2 g
Bacto-Yeast extract	0.5 g
NaCl 1M	1 ml
KCl 1M	0.25 ml
Mg 2M	1 ml
Glucosio 2M	1 ml

### **Isolamento delle colonie trasformate:**

L'antibiotico presente nelle piastre permette di selezionare le cellule batteriche trasformate poiché il vettore pGEM contiene un gene che conferisce resistenza all'ampicillina. L'X-Gal e l'IPTG permettono invece di distinguere tra le cellule trasformate con un plasmide senza inserto da quelle trasformate con un plasmide contenente l'inserto di interesse. Infatti il vettore pGEM contiene una sequenza codificante per l'enzima  $\beta$ -galattosidasi che utilizza come substrato l'X-Gal producendo un precipitato blu. L'IPTG induce la trascrizione dell'enzima. La sequenza codificante l'enzima contiene però anche il sito per l'inserzione del frammento di DNA. Quindi le colonie batteriche che contengono un plasmide senza inserto sono di un colore blu

intenso se, mentre se la sequenza della  $\beta$ -galattosidasi viene interrotta dall'inserzione di un frammento di DNA sono bianche.:

Si prelevano le colonie bianche e si piastrano nuovamente in piastre petri contenenti medium LB in modo da moltiplicare le singole colonie.

È necessario verificare la presenza effettiva dell'inserito: si è eseguita una PCR del tutto analoga a quella iniziale (vedi tabelle 3.2 e 3.3) ma sostituendo al DNA genomico una colonia batterica bianca prelevata direttamente da una piastra ("colony" PCR). Il prodotto dell'amplificazione è stato separato su gel di agarosio al 1% in tampone TAE 1X e colorato con una soluzione di bromuro di etidio (vedi tabella). Le colonie in cui si è riscontrata la presenza di una banda corrispondente all'inserito sono state prelevate singolarmente e fatte crescere su substrato LB liquido per preparare degli stock di batteri in glicerolo in modo da poterli conservare per lunghi periodi a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Estrazione del plasmide**

L'estrazione del plasmide segue il protocollo adattato da Birnboim H.C. and Doly J. 1979

1. Far crescere i batteri overnight in 5 ml di LB medium contenente ampicillina.
2. Riempire un tubo da 2ml con la cultura e centrifugare alla massima potenza per 1 minuto
3. Rimuovere il surnatante completamente
4. Ri-sospendere le cellule con 200 $\mu\text{l}$  di soluzione LYR. Incubare 5 minuti a temperatura ambiente

5. Aggiungere 400  $\mu$ l della soluzione alcalina con SDS, mescolare per inversione. La miscela dovrebbe diventare viscosa e trasparente. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
6. Aggiungere 300 $\mu$ l della soluzione salina e mescolare bene. Si forma una sostanza bianca flocculente (resti cellulari e DNA cromosomiale). Incubare 30 minuti in ghiaccio.
7. Centrifugare 5 minuti alla massima potenza. Trasferire il liquido in un tubo pulito.
8. Precipitare gli acidi nucleici in uguale volume di (800 $\mu$ l) di isopropanolo 5 minuti a temperatura ambiente
9. Centrifugare e pulire il pellet con 1ml di etanolo 80%.
10. Dopo aver eliminato l'etanolo, seccare il pellet e risospendere in 50 $\mu$ l di acqua.

### **Soluzioni:**

#### **LYR**

Glucosio	10%
EDTA	10mM
Tris	25mM
Lysozima	2mg/ml
Rnasi A	2mg/ml

Conservare in aliquote di 1,5ml a  $-20^{\circ}\text{C}$

Soluzione alcalina con SDS

NaOH                    0,1M

SDS                      2%

Soluzione salina

3M KOAc, pH 4.8

Il sequenziamento degli inserti è stato eseguito presso il centro bioinformatico della Virginia Tech University (VBI, USA) oppure sono stati sequenziati dalla ditta MWG GmbH (M-Medical, Germany).

## **ANALISI DI ESPRESSIONE**

Alla base di tutte le analisi di espressione c'è l'estrazione dell'RNA. Sebbene siano stati provati differenti metodi, quello che è risultato migliore per estrarre RNA di qualità da bucce e da foglie di pero, di seguito descritto è stato il metodo CTAB. Questo metodo è stato utilizzato per tutte le analisi d'espressione.

### **Accorgimento per lavorare con l'RNA**

Per minimizzare la perdita di RNA per degradazione ad opera delle Rnasi, sono sempre stati seguiti alcuni accorgimenti per inattivarle:

- minimizzazione della contaminazione dalle Rnasi presenti sulle mani.  
Al fine di evitare la contaminazione con le Rnasi presenti sulle mani sono sempre stati usati guanti in lattice.
- Trattamento delle soluzioni di lavoro con DEPC. L'acqua e tutte le soluzioni utilizzate sono state addizionate con 0,1% di DEPC. Per dissolvere il DEPC, dopo l'aggiunta, le soluzioni sono state vigorosamente agitate per almeno 12 ore. Successivamente, sono state autoclavate a 120°C per 20 minuti per inattivare il DEPC rimanente. Dopo la sterilizzazione termica, le soluzioni sono state periodicamente agitate per favorire il rilascio della soluzione della CO<sub>2</sub> e per prevenire la formazione di acido carbonico. Il DEPC non è mai stato utilizzato con i tamponi Tris. Questi tamponi sono sempre stati preparati in vetreria sterile, utilizzando acqua precedentemente sterilizzata con DEPC.

- Trattamento della vetreria. La vetreria è stata posta a 200°C per 4 ore oppure immersa in NaOH 0.1 N per 1 ora, sciacquata con abbondante acqua distillata e autoclavata per 20 a 120°C. il doppio trattamento assicura l'inattivazione delle RNasi che, la semplice sterilizzazione a 120°C non è in grado di disattivare.

Il materiale plastico, è stato immerso in una soluzione di acqua trattata con DEPC per 30-60 minuti. Quindi è stato lasciato ad asciugare all'aria. Avvolto in carta e autoclavato per 20 minuti a 120° C. Il materiale plastico sterile (es. puntali, provette, etc), non aperto è stato considerato accordo con quanto riportato sull'etichetta di manifattura, Rnase-free.

### **Metodo di estrazione dell'RNA**

Per estrarre l'RNA si è seguito un protocollo simile a quello per l'estrazione del DNA. Essendo il pero un materiale recalcitrante, ricco di polisaccaridi che interferiscono nell'estrazione degli acidi nucleici si è optato per un protocollo con l'utilizzo del CTAB (Esadecil-trimetil-ammonio-bromidio) è un detergente che elimina i polisaccaridi dalle cellule vegetali.

Il protocollo usato non prevede l'impiego di fenolo bensì di cloroformio-isoamilico (24:1) giudicato meno pericoloso

## **Soluzioni e reagenti**

H<sub>2</sub>O distillata trattata con DEPC (H<sub>2</sub>O DEPC)

### **Tampone di estrazione**

CTAB	2%
PVP	2%
EDTA	0,5M
NaCl	5,8%
Spermidina	0,05%
TrisHCl	5%

Il tampone può essere conservato a -20°C

### **Soluzione SSTE**

NaCl	1M
SDS	0,5%
TrisHCl	10mM
EDTA	1mM

Conservare a temperatura ambiente e riscaldare prima dell'uso per sciogliere l'SDS

### **Protocollo:**

- Pre-riscaldare il buffer di estrazione ed aggiungere 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanolo prima dell'uso
- Sminuzzare finemente in azoto liquido 1g di materiale vegetale.
- Trasferire il materiale in tubi da 50 ml

- Aggiungere 5ml di buffer pre-riscaldato e mantenere per 15 minuti nel bagnetto termostatico agitando ogni 5 minuti
- Aggiungere 5 ml di cloroformio-isoamilico (24:1). Agitare molto bene.
- Centrifugare per 30 minuti a 10.000g
- Recuperare il surnatante e ripetere il lavaggio con cloroformio-isoamilico (24:1).
- Dopo aver recuperato il surnatante si aggiunge LiCl 8M arrivando ad una concentrazione finale di 3M
- Dopo una precipitazione overnight a 0°C (in ghiaccio) si centrifuga a 15500g per 35minuti
- Il pellet viene dissolto in 1 ml di soluzione SSTE
- Dopo aver trasferito il contenuto in eppendorf da 2ml si effettua un nuovo lavaggio in cloroformio/isoamilico 24:1
- Recuperato il surnatante si aggiunge un egual volume di etanolo 100%.
- Si precipita e si risospende in 50µl H<sub>2</sub>O DEPC

### **Trattamento con DNasi**

Il trattamento di DNasi è stato eseguito con Turbo DNFree della Ambion

Dopo l'estrazione di RNA si esegue la purificazione da DNA contaminante. Si usano tubi da 0,5 ml per facilitare la rimozione del surnatante.

- Aggiungere 0,1 volumi di 10x Turbo Dnase buffer e 1µl di turbo Dnase e invertire gentilmente
- Incubare a 37°C per 20-30 minuti

- Si aggiunge 0,1 volumi di Dnase Inactivation Reagent e si mescola bene.
- Incubare 2 minuti a temperatura ambiente
- Centrifugare a 10.000 g per 1 minuto e trasferire l'RNA in un nuovo tubo

### **Quantificazione dell'RNA e determinazione della purezza**

Per ogni campione 1µl di soluzione di RNA è stata misurata con lo spettrofotometro NanoDrop ND- 1000 UV-Vis. Lo strumento fornisce direttamente la concentrazione del campione, espressa in ng/µl, e i rapporti di assorbenza: 260/230nm e 260/280nm che permettono di stimare la purezza dell'RNA (da vari contaminanti quali proteine, polisaccaridi e fenoli).

Quindi 1 µg ca di RNA totale è stato caricato su gel di agarosio all'1 % in TAE 1X per verificarne l'integrità.

### **Analisi di Real Time PCR quantitativa**

Le analisi di real time quantitativa sono state eseguite per valutare l'espressione dei geni della via biosintetica delle antocianine, responsabili con molta probabilità della pigmentazione dell'epicarpo, durante le fasi di maturazione dei frutti.

### **Sintesi del primo filamento di cDNA**

Per un volume di reazione di 20µl, è stato utilizzato 1 µg di RNA totale, preventivamente diferito con DNase.

In un tubo da 200µl Rnase-freesono stati aggiunti i seguenti componenti:

RNA totale (1ug)	x
Oligo (dT)12-18(500 ug/ml)	1µl
10mM dNTP Mix	1µl
H2O sterile	fino a 12µl

Incubare a 65°C per 5 minuti e rapidamente raffreddare in ghiaccio, in seguito centrifugare brevemente. Successivamente aggiungere:

5x for strand buffer	4µl
0.1 M DTT	2µl
RNaseOUT Invitrogen (40 units/ul)	1µl

Mescolare gentilmente e incubare 2 minuti a 37°C

Velocemente aggiungere 2µl M-MLV RT (Invitrogen), mescolare gentilmente. Incubare per 50 minuti a 37°C e inattivare la reazione scaldando a 70°C per 15 minuti

Il cDNA è ora disponibile come template per le amplificazioni in PCR.

## qRT-PCR

Il protocollo utilizzato per ogni gene è il seguente:

<b>componente</b>	<b>Quantità (ul) x</b>
	1
cDNA (1:9)	5 µl
Syber green_er	10 µl
Primer for (10µM)	0.4 µl
Primer rev (10µM)	0.4 µl
H <sub>2</sub> O	4.2 µl
<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>

Gli esperimenti sono stati condotti usando lo strumento ABI PRISM®7000 in plate da 96 campioni. Ogni sequenza è stata amplificata da cDNA dai 4 diversi campionamenti (45gg, 60gg, 90gg, 120gg) su frutto e 1 su foglia appena germogliata, ciascuno replicato 3 volte.

Le condizioni di PCR utilizzate sono:

1. 50°C      2'
2. 95°C      10'      per attivare la DNA polymerasi
3. 95°C      15"      } x 40
4. 60°C      60"      }
5. 95°C      5'

il punto 5 del ciclo di Real Time PCR permette di visualizzare le curve di dissociazione per ciascun frammento e verificare l'assenza di aspecifici.

I primer utilizzati sono stati disegnati per amplificare segmenti dei geni di interesse compresi tra le 120 bp e le 190bp, ottimali per la reazione di Real Time PCR ed evitare artefatti:

Primer disegnati per l'analisi qPCR sono:

ACT (ID; DT002474)

For 5' TATGAAGGGTATGCCCTCCC

Rev 5' CTGTAAGATCACGACCCGCC

CHS

For 5' ACAAACCATTATCCCCGACA 3'

Rev 5' CAGAAGAGCGAGTCCCAATC 3'

CHI

For 5' AGAAGGCAAAGCCATTGAAA 3'

Rev 5' GCTTTCCAACGATCGACTCT 3'

F3H

For 5' CTACTIONCGGGATGATGGGAAA 3'

Rev 5' GGCTATGGACAGCCTGCTAC 3'

DFR

For 5' GAATGGATGGCGTGAGAAAT 3'

Rev 5' ATGTTGAATTTTGCCGCTTC 3'

ANS

For 5' GACCTTCCCATTGAGCAGAA 3'

Rev 5' CAAGTCACGCTTGTCTCTG 3'

UFGT

For 5' TTGCTAGCAGCTCCTTCTCC 3'

Rev 5' CCCCATAACAAACGACCTAA 3'

MYB

For 5' AGTGGGTAGCAGGCAAAAGA 3'

Rev 5' TCCACTTCCCTCTCCATGA 3'

### **Analisi dei dati Real Time**

Le analisi dei dati di real time è basata normalmente sulla assunzione che tutti i campioni analizzati abbiano la stessa efficienza di PCR per uno specifico amplicone. In un recente lavoro (Ramakers et al, 2003) si è dimostrato che piccole variazioni nell'efficienza della PCR possono condurre a errate interpretazioni dei livelli di espressione.

Per eliminare questo problema è stata calcolata l'efficienza di ogni singola coppia di primer con il programma LinRegPCR, il quale usa la fluorescenza misurata per ogni campione in ogni ciclo. Questo approccio è basato sulla linearizzazione della formula base per le amplificazioni esponenziali di PCR prendendo il logaritmo di entrambi i membri:

$$\text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(\text{eff.}) \times C$$

Dove  $N_c$  e  $C$  sono le misure dei dati di fluorescenza e il numero dei cicli rispettivamente, mentre  $\text{log}(N_0)$  e  $\text{Log}(\text{eff.})$  sono l'intercetta e l'inclinazione che vengono calcolate.

L'efficienza ottenuta è stata usata per i successivi calcoli di differenza di espressione dei geni nelle due cultivar William (giallo) e Max Red Bartlett (rosso).

$$\text{RAPPORTO} = \frac{(\text{Gene}_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}} (\text{controllo} - \text{trattato})}}{(\text{Gene}_{\text{referente}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{referente}} (\text{controllo} - \text{trattato})}}$$

Con questa formula sono stati calcolati i rapporti di espressione per ogni singolo gene. Quindi con gene target viene indicato l'efficienza di amplificazione del gene studiato (es:CHS) elevato alla  $\Delta\text{Ct}$ .

Il  $\Delta\text{Ct}$  è la differenza tra il Ct di William (controllo) meno il Ct di Max Red Bartlett (trattato). In questo modo una maggiore espressione del gene in Max Red Bartlett rispetto a William avrebbe prodotto un valore positivo, negativo se l'espressione fosse stata minore. Al fine poi di eliminare errori procedurali che abbiano influenzato la quantità di cDNA iniziale che potrebbero falsare il risultato finale, sono stati eseguiti gli stessi calcoli con il gene referente (Actina). Si è scelto l'actina perché è un gene sempre espresso in tutti i tessuti e in tutte le diverse fasi di sviluppo della pianta.

Il valore Ct è stato calcolato automaticamente dal software, solo in rari casi è stata modificata la linea di baseline al fine di evitare letture errate dovute a contaminazioni nei primi cicli da PCR. Tutte le prove sono state ripetute tre volte per campione e si è fatta una media tra i tre valori ottenuti. È stata calcolata anche la temperatura di melting per ogni singola PCR, per confermare che il prodotto PCR fosse quello desiderato.

I valori ottenuti dai rapporti precedentemente calcolati sono stati poi trasformati in Log a base 2, questo per avere valori trasportabili in grafico in modo che non andassero fuori scala.

## **ANALISI FENOTIPICHE**

### **HPLC**

Per entrambe le varietà sono state effettuate analisi fenotipiche in diversi step. Innanzi tutto si è proceduto con una analisi preliminare in HPLC per osservare se vi fossero differenze nella produzione di composti con assorbimento specifico delle antocianine e dei flavonoidi in generale. L'estrazione sono state eseguite su frutti maturi raccolti a 120 giorni dalla piena fioritura, usando tubi da 1,5ml.

1. macinare 20mg di tessuto fresco in azoto liquido in un mortaio di ceramica
2. trasferire il macinato nel tubo da 1,5ml
3. aggiungere immediatamente extraction buffer (100µl)
4. centrifugare alla massima velocità per 5minuti
5. Trasferire il campione in due tubi nuovi.

Una metà verrà usata per una estrazione con idrolisi, l'altra è già pronta per essere utilizzata verificando anche la presenza di gruppi glucosidici. L'estrazione con idrolizzazione elimina i gruppi glucosidici e permette l'analisi degli agliconi (antocianine prive di gruppo glucoside).

L'estrazione quindi continua come segue:

6. aggiunta di un egual volume di HCl 2N in metanolo scaldato a 70°C per 40 minuti
7. centrifugare ed incubare a 4°C per 10 minuti

Sono stati introdotti 30ul di campione usando un Waters 2690 Separations Module e una colonna C18 reverse phase (Waters Nova-Pak<sup>®</sup> 60 Å, 4 µm, 3.9×150 mm) come descritto (Pelletier et al., 1999). L'eluato è stato monitorato ad una lunghezza d'onda compresa tra 220–520nm usando un Waters 996 PDA detector.

### **LC-MS**

Le analisi in spettrometria di massa associate all'HPLC avevano lo scopo di identificare le differenze nella composizione dei pigmenti colorati tra William e il suo mutante Max Red Bartlett.

L'estrazione dei flavonoidi è stata fatta da epidermide di frutti maturi. I frutti sono stati raccolti in campo e lavati. Le bucce sono state tagliate con un cutter e immediatamente immerse in azoto liquido. In laboratorio è stata eseguita una macinazione con mortaio e pestello in ceramica evitando lo scongelamento. Successivamente il macinato è stato liofilizzato.

### **Estrazione per LC-MS**

L'estrazione è relativamente semplice e non richiede particolari attenzioni. È necessario comunque lavorare sempre con materiale di prima qualità onde evitare inquinamenti o artefatti. Per entrambe le varietà sono state pesate aliquote da 30mg ciascuna alle quali è stato aggiunto 600µl di buffer di estrazione con uno standard interno (reserpine 5µg/ml).

### **Buffer di estrazione**

75% MeOH	187.5ml
5% Formic Acid	12.5
H <sub>2</sub> O	50ml

I campioni estratti possono essere conservati a - 20°C.

La separazione in LC/MS è stata eseguita usando l'apparato Shimadzu costituito da un analizzatore ion\_trap con sistema di iniezione ESI (Electron Spray Injection). La colonna cromatografia era una Hypersyl Gold Thermo Electron Corporation (dim 150 x 2.1 mm, particle size 3 (u))

Allo spettrometro di massa è stato collegato un PDA (Photodiode Array Detector, Surveyor Thermo Finnigan), in modo da verificare la presenza di molecole con spettro di assorbimento compreso tra 320nm (specifico per le antocinidine) e i 520 nm (specifico per i flavonoidi glucosilati).

Tutto l'apparato era collegato ad un robot che iniettava i campioni e ad ogni ciclo puliva sempre la siringa. L'automazione è fondamentale per avere analisi ripetibili.

### **Cromatografia**

Le condizioni della corsa cromatografia in LC/MS è stata eseguita con due solventi. Una soluzione acquosa (solvente A) di acido formico allo 0,5% e una soluzione di metanolo 100% (soluzione B). le condizioni di gradiente di eluizioni sono descritte in tabella.

Gradient Elution Conditions (A, 0.5% formic acid in water; B, Methanol)

Time (min)	A (%)	B (%)	elution
0	100	0	
1	80	20	Gradiente lineare
0.2	30	70	Gradiente lineare
12.5	30	70	pausa
0.15	5	95	Gradiente lineare
3	0	100	

## GC-MS

Le analisi in spettrometria di massa associate al Gas Cromatografo avevano lo scopo di confrontare ed individuare i composti volatili e zuccherini nelle due cultivar.

La maggior parte delle analisi sui composti di zucchero sono state eseguite con un Trace GC Thermo Finnigan associato ad un Trace DSQ Thermo Finnigan (Quadrupolo). Le analisi sono state condotte con una colonna AT-5MS (Alltech, 30 m + 5m, i.d. 0.25 mm; film thickness 0.25 mm).

## Estrazione per gc/ms

I frutti dopo essere stati lavati sono stati sbucciati. La buccia è stata raccolta e liofilizzata.

1. Aliquotare 10 mg di campione liofilizzato e aggiungere 1,4ml di metanolo e 50µl di internal standard (ribitol (adonitol), 50µg/mL).
2. Macinare il campione utilizzando il Mixer Mill per 60 sec alla massima velocità per tre volte.

3. trasferire il tessuto polverizzato in una fiala pulita 13x65
4. aggiungere 1,4ml di acqua MilliQ e vortexare
5. incubare a 70°C per 30 minuti
6. aggiungere 2ml di cloroformio e vortexare per 1 minuto
7. centrifugare a 4800 rpm per 30 minuti a 4°C
8. recuperare la fase polare (superiore, metanolo:acqua)
9. Seccare il campione in speed vacuum. È MOLTO IMPORTANTE CHE IL CAMPIONE SIA COMPLETAMENTE SECCATO. OGNI RESIDUO INTERFERIRÀ CON LA SUCCESSIVA DERIVATIZZAZIONE. Generalmente sono necessarie circa 6 ore, dipende dalla quantità del campione

#### 1° Derivatizzazione

1. aliquotare 80µl di metoxyamine hydrocloridina in piridina
2. incubare a 30°C per 1 ora

#### 2° Derivatizzazione

1. aggiungere 80µl di MSTFA + 1% TMCS (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide; Chloro-trimethylsilane)

NOTA: quando si aggiunge il MSTFA si può vedere del vapore. SE il tuo campione si RISCALDA, questo indica che ci sono delle impurità. Stop e riprendere dallo speed vacuum per seccare meglio.

2. incubare a 37°C per 30 minuti

L'iniezione del campione avveniva automaticamente grazie ad un robot associato al gas-cromatografo. Esso prelevava 1µl di campione, 1µl di aria ed 1µl di standard interno (8 alkanes in exanes 10µg/ml). La temperatura dell'iniettore era stata settata a 250°C. La miscela attraversava la colonna in dipendenza della temperatura della stessa. Per questa ragione sono state fatte diverse prove per ottenere una buona separazione dei composti. Il programma finale prevedeva una temperatura iniziale di 70°C che poi aumentavano fino a 310°C con una velocità di 5 °C/min.

#### **HS/SPME (Headspace solid phase microextraction)**

Per i composti volatili è stato usato un sistema HS/SPME (supelco, Bellafonte, PA, USA) costituito da 10mm di fibra artificiale ricoperta da 50/30µm Divinilbenzeb/carboxen/PDMS (DVB/CAR/PDMS).

Ad 1g di buccia macinata è stato aggiunto 100µl di IS solution (Internal Standard Solution: 8 alkanes in exanes 10µg/ml) e poi trasferito in una fiala (reference SU860100 supelco, Bellafonte, PA, USA, "screw cap vial Amber Glass, for SPME 10ml, 22.5 x 46 mm"). L'estrazione è stata eseguita con uno spazio vuoto di con una distanza dalla superficie liquida di 45mm ad una temperatura di 60°C per 25 minuti su un agitatore magnetico (250 rpm per 5secondi e 2 secondi di pausa).

## **RISULTATI**

## **Analisi del colore dei frutti**

Le analisi del colore dei frutti sono state eseguite con lo strumento Minolta CR300. Le misure sono state fatte sulle due cultivar William e Max Red Bartlett prendendo 10 frutti per campionamento. In William ogni misura è stata eseguita sul lato non esposto al sole, quindi senza la presenza di sovra-colore rosso, che durante la maturazione copre tra il 5 e 15% dell'intera superficie. È noto che possono essere indotti dalla luce, in particolare dai raggi UV, e anche da stress ambientali come il freddo (Dong et al. 1998). In Max Red Bartlett invece il sovra-colore rosso copre il 100% della superficie del frutto per quasi tutto il periodo di maturazione. Solo nell'ultimo campionamento (120gg) la parte non esposta al sole perde la colorazione rossa. Dato che lo scopo di questa tesi era lo studio della diversa espressione dei geni coinvolti nella formazione del colore rosso le misure sono state eseguite sul lato in cui esso era più presente in Max Red Bartlett. I campionamenti sono gli stessi utilizzati per le analisi di espressione dei geni putativi coinvolti nella sintesi del colore.

**Tabella 4.1 Dati colore su MRB 45 gg.**

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	33.91	15.62	10.16
2	30.71	16.64	6.97
3	31.15	15.36	5.79
4	31.12	18.02	6.09
5	31.1	17.05	7.96
6	31.77	16.47	7.59
7	32.33	16.51	7.6
8	31.14	15.41	5.99
9	31.17	15.54	5.77
10	34.55	15.02	7.98
<b>MEDIA</b>	<b>31.895</b>	<b>16.164</b>	<b>7.19</b>

**Tabella 4.2 Dati colore su William 45 gg**

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	45.55	-7.06	25.21
2	46.36	-12.33	36.55
3	44.52	-14.01	31.1
4	46.91	-10.04	32.39
5	49.61	-14.14	36.87
6	57.12	-6.14	27.06
7	52.16	-8.3	34.81
8	56.18	-8.34	27.14
9	45.92	-12.11	25.36
10	55.71	-15.08	37.43
<b>MEDIA</b>	<b>50.004</b>	<b>-10.755</b>	<b>31.392</b>

Dal primo campionamento (tab. 4.1 e 4.2) i dati ottenuti confermano la netta diversità fra le due cultivar. È interessante comunque osservare la spiccata differenza nel parametro a\* il quale indica il rosso se è positivo e verde se invece è negativo.

Di seguito (tab. 4.3 e 4.4) sono riportati anche i dati del secondo campionamento, a 60 giorni dopo la piena fioritura.

**Tabella 4.3 Dati colore su MRB 60 gg.**

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	36.17	15.52	6.88
2	34.55	15.1	11.55
3	33.62	15.2	8.47
4	33.44	19.02	11.17
5	31.55	15.65	5.93
6	31.15	14.24	5.49
7	32.71	16.73	8.48
8	32.79	15.49	6.09
9	31.68	16.4	5.71
10	31.09	16.1	7.51
<b>MEDIA</b>	<b>32.50889</b>	<b>15.99222</b>	<b>7.728</b>

**Tabella 4.4. Dati colore su William 60 gg.**

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	49.83	-8.76	29.82
2	47.74	-5.52	26.79
3	54.6	-12.85	36.78
4	57.12	-14.18	31.74
5	48.51	-8.43	33.54
6	52.37	-11.29	36.44
7	54.67	-12.36	34.01
8	46.92	-7.46	31.64
9	46.23	-9.99	32.03
10	51.98	-11.47	27.55
<b>MEDIA</b>	<b>51.00</b>	<b>-10.231</b>	<b>32.034</b>

I frutti di Max Red Bartlett nei primi tre campionamenti sono rossi nel del 100% della superficie. Quelli di William invece mostrano sempre una bronzatura rossastra sul lato esposto al sole che varia dal 5 al 15% della superficie. Questo effetto è ancora più marcato nelle fasi finali della maturazione. Per questo motivo i dati del minolta sono stati presi sul lato non esposto al sole. Lo stesso criterio, in omologia, è stato mantenuto per il campionamento che è stato effettuato per le analisi di espressione genica.

**Tabella 4.5** Dati colore su MRB 90 gg

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	27.81	12.53	5.64
2	33.26	7.63	13.75
3	26.98	14.71	4.83
4	37.25	6.44	15.28
5	25.26	14.63	5.68
6	35.33	8.31	10.05
7	28.51	13.07	8.99
8	36.63	7.84	14.58
9	33.14	12.64	11.82
10	26.38	9.54	7.65
<b>MEDIA</b>	<b>31.055</b>	<b>10.734</b>	<b>9.827</b>

**Tabella 4.6** Dati colore su William 90 gg

<b>Campione</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
1	47.09	-9.64	33.54
2	44.86	-7.35	24.06
3	49.31	-15.62	26.87
4	46.35	-13.54	29.3
5	40.98	-9.37	30.3
6	49.76	-13.25	36.45
7	43.76	-11.87	27.86
8	51.38	-10.84	24.05
9	44.86	-13.39	26.13
10	46.51	-14.62	30.58
<b>MEDIA</b>	<b>46.486</b>	<b>-11.949</b>	<b>28.914</b>

Nell'ultimo campionamento si può notare in Max Red Bartlett il progressivo aumento della luminosità e anche della porzione gialla (parametro b\*), evidenziando quello che visivamente appare come un calo dell'intensità del colore rosso e anche una striatura dello stesso con presenza di giallo.

**Tabella 4.7** Dati colore su MRB 120 gg

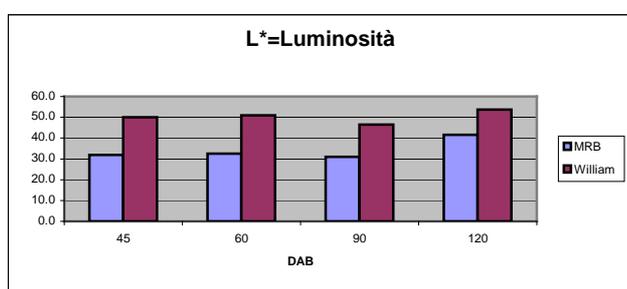
Campione	L*	a*	b*
1	44.25	12.16	18.53
2	45.27	7.4	26.56
3	41.22	8.31	16.47
4	39.14	17.56	17.29
5	42.4	10.6	22.84
6	40.7	6.63	21.68
7	42.87	15.33	25.63
8	46.21	9.45	23.71
9	36.63	13.34	26.51
10	37.45	12.21	19.11
<b>MEDIA</b>	41.614	11.299	21.833

**Tabella 4.8** Dati colore su William 120 gg

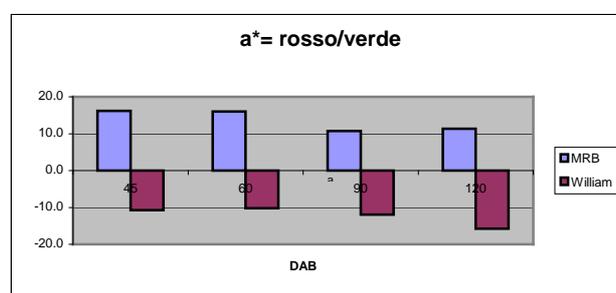
Campione	L*	a*	b*
1	54.78	-13.15	39.53
2	56.79	-19.09	42.55
3	50.23	-12.78	31.95
4	54.19	-14.39	35.26
5	53.88	-17.74	39.02
6	50.71	-13.29	43.29
7	55.32	-15.01	42.05
8	50.33	-18.99	33.15
9	56.45	-16.68	36.82
10	55.16	-16.45	38.16
<b>MEDIA</b>	53.784	-15.757	38.178

Di seguito sono mostrati i grafici che rappresentano il mutare del colore durante la maturazione dei frutti (Fig. 4.1 e 4.2). Per quanto riguarda la luminosità (L\*) si vede come in Max Red Bartlett si passi da un colore più scuro ad uno più chiaro e la luminosità tende ad aumentare con la maturazione del frutto. In William invece si può vedere come questo andamento sia meno

evidente anche se il dato di luminosità maggiore si ha nelle fasi finali di sviluppo.



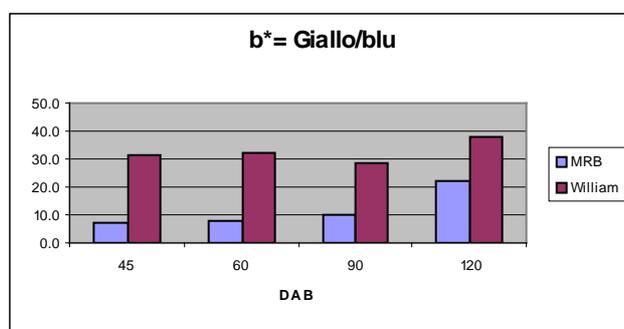
**Figura 4.1: Valori del parametro L\*.** In ascisse sono segnati i giorni dopo la piena fioritura (DAB), in ordinate il valore del parametro L\*.



**Figura 4.2: Valori del parametro a\*.** In ascisse sono segnati i giorni dopo la piena fioritura (DAB), in ordinate il valore del parametro a\*.

Il carattere del rosso e verde, calcolati dal parametro a\*, non poteva che confermare la netta differenza tra le due varietà. È interessante comunque notare l'andamento del colore, dove in Max Red Bartlett sia maggiormente espresso nel primo campionamento. Il colore verde invece in William cala drasticamente già a 90 giorni dopo la piena fioritura, riflettendo l'inizio della sintesi di pigmenti.

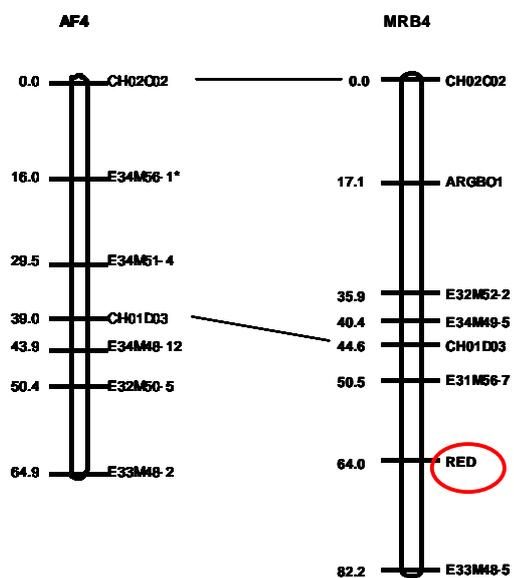
Il parametro del colore giallo ( $b^*$ ) domina nel frutto di William rispetto a quello di Max Red Bartlett (Fig. 4.3). Si può notare come nell'ultimo campionamento ci sia un incremento che caratterizza le fasi finali di maturazioni. Anche in Max Red Bartlett possiamo vedere lo stesso processo con un aumento della porzione gialla nell'ultimo campionamento. Nel frutto maturo infatti il colore rosso non è più acceso ma è spento proprio a causa delle striature gialle che emergono.



**Figura 4.3:** Valori del parametro  $b^*$ . In ascisse sono segnati i giorni dopo la piena fioritura, in ordinate il valore del parametro  $b^*$ .

### **Mappaggio del marcatore morfologico “colore rosso” nella popolazione Abate Fetél x Max Red Bartlett**

Sulla popolazione di incrocio Abate Fetel (gialla) x Max Red Bartlett (rossa) è stato possibile analizzare la segregazione del carattere “colore rosso dell'epicarpo”. I semenzali appartenenti a questa popolazione, oltre a dimostrare l'ereditarietà del carattere, erano per il 50% gialli e 50% rossi. Questo ha permesso il mappaggio di questo carattere/mutazione come marcatore morfologico nel linkage group 4 del parentale Max Red Bartlett



**Fig 4.4.** Linkage group 4 delle varietà Max Red Bartlett (MRB) e Abate Fétel (AF). Le distanze di ricombinazione in cM sono calcolate tutte per un LOD pari a 4.

### Clonaggio e caratterizzazione dei geni putativi

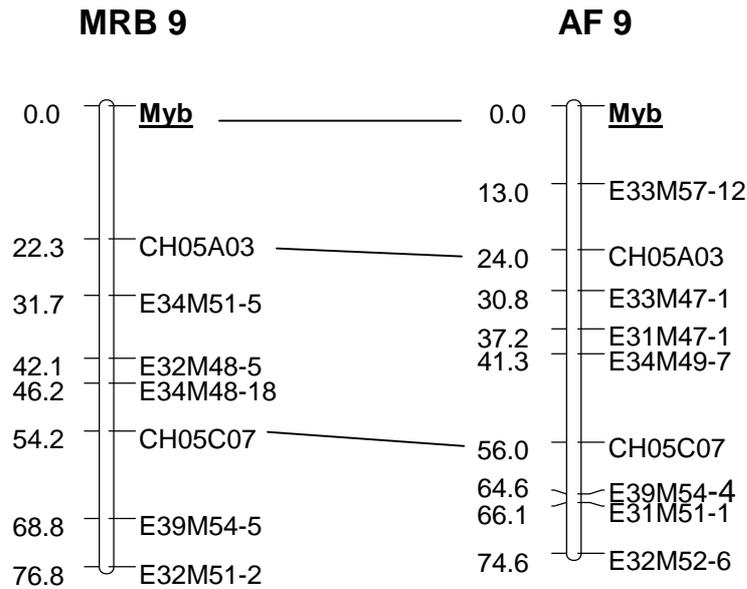
Tutti i primer sono stati disegnati in base alle sequenze di melo e pero disponibili in banca dati. Per ogni sequenza sono stati disegnati diversi primer in modo da essere sicuri di ottenere il migliore amplificato possibile per le analisi. In alcuni casi come, F3H e DFR, l'altissima omologia tra melo e pero ha permesso l'amplificazione quasi totale del gene, negli altri casi invece è stato necessario utilizzare primer sempre più vicini, che amplificassero frammenti più brevi, in modo da facilitare l'amplificazione.

GENI	Bp	N° introni
CHS	368	1
CHI	361	1
F3H	1095	4
DFR	1475	4
ANS (LDoX)	892	2
UFGT	546	1
Myb	391	1

**Tabella 4.9.** Lunghezza dei frammenti sequenziali dei putativi geni della via biosintetica delle antocianine e numero di introni trovati

Non sono stati evidenziati polimorfismi di sequenza in nessuna delle sei sequenze di geni direttamente coinvolti nella sintesi degli antociani tra William e Max Red Bartlett e nessun polimorfismo tra Abate Fétel e Max Red Bartlett. Il gene codificante per il fattore di trascrizione "Myb" invece presentava un polimorfismo che ne ha reso possibile il mappaggio nel linkage group 9. La presenza di un dominio microsatellite ha infatti permesso il

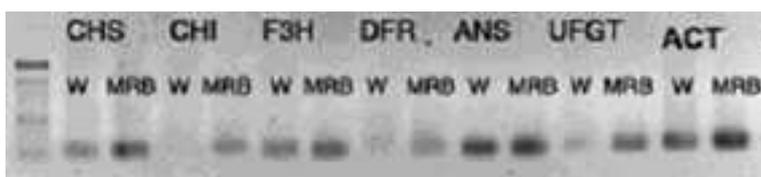
mappaggio di questo marcatore funzionale nei due parentali di mappa in quanto co-dominante (Fig 4.5.).



**Fig. 4.5** Linkage group 9 delle varietà Max Red Bartlett (MRB) e Abate Fétel (AF). Le distanze di ricombinazione in cM sono calcolate tutte per un LOD pari a 4. I microsatelliti CH05A03 e CH05C07 mappano in entrambe le cultivar a distanze molto simili. Il fattore di trascrizione Myb dista per 22cM da CH05A03 in MRB e 24 cM in AF.

## Analisi d'espressione genica con qRT-PCR

Per studiare la variazione di espressione differenziale dei geni putativi, responsabili della sintesi dei pigmenti antocianici, è stata usata la tecnica di amplificazione genica in tempo reale (qRT-PCR). Gli esperimenti sono stati condotti sui geni CHS, CHI, F3H, DFR, ANS (LDoX) e UFGT. Tali geni sono stati identificati come i responsabili della sintesi delle antocianine in piante modello (Winkel S.J. B. 2001). A questi è stato aggiunto un fattore di trascrizione "Myb", sequenziato recentemente in melo (Takos 2006).



**Fig. 4.6.** Amplificazione frammenti di cDNA con primer dei geni candidati

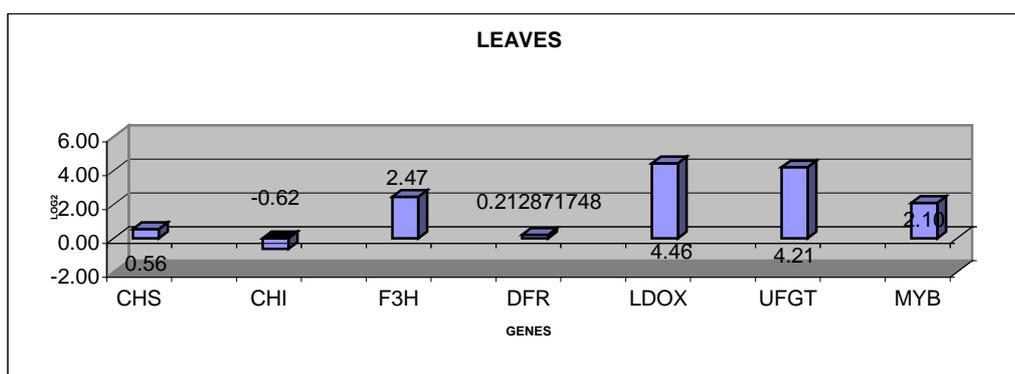
Per ogni gene scelto sono stati disegnati primer di 20bp circa, in grado di amplificare frammenti compresi fra 130 e 190 bp, con una temperatura di annealing di 60°C. ogni coppia di primer è stata testata su cDNA retrotrascritto da RNA (digerito con DNase) di entrambe le cultivar William e Max Red Bartlett. Il prodotto di amplificazione è stato controllato su gel di agarosio all'1% (Fig 4.6). Per normalizzare i dati è stata utilizzata l'actina, la cui espressione è apparsa costante nelle due cultivar.

Sulle foglie è stato fatto un solo campionamento in relazione al fatto che in MRB presentano una colorazione rossastra solo nei primi giorni di crescita, a differenza di William che invece mantiene sempre una colorazione verde.

I geni F3H, LDoX, UFGT e Myb hanno mostrato una sovra-espressione in MRB rispetto a William. Solo il gene DFR ha mostrato una espressione in MRB minore rispetto a William. Sono stati considerati significativi solo i valori superiori a 2 e minori a 0,5 corrispondenti a valori di log2 a +1 e -1 rispettivamente. Quindi i geni CHS e CHI sono stati considerati come aventi una uguale espressione in MRB e Wil.. Successivamente i valori sono stati calcolati in logaritmo a base 2 in modo da avere dati positivi (sovra-espressi) e negativi (sotto-espressi) in scala tali da poter disegnare il grafico corrispondente(Fig 4.7).

**Tabella 4.10.** rapporto di espressione di ogni singolo gene in foglie giovani tra MRB e William.

gene	rapporto d'espressione MRB/William
CHS	1.47
CHI	0.65
F3H	5.53
DFR	1.16
LDOX	21.95
UFGT	18.54
MYB	4.30



**Figura 4.7** Analisi di espressione qRT-PCR per i geni putativi coinvolti nella sintesi degli antociani. Sull'asse delle ascisse è riportato la sigla del gene, sulle ordinate il rapporto di espressione MRB/William in log2.

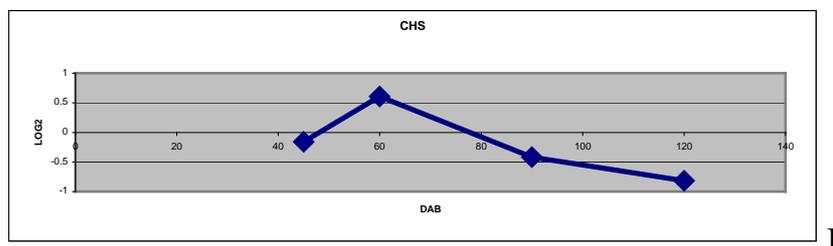
Le analisi di espressione effettuate sui campioni di epidermide da frutto sono stati condotti su quattro campionamenti effettuati durante la maturazione prendendo come punto di riferimento la data di piena fioritura. Il primo campionamento è stato fatto a 45 giorni dopo la data in questione (DAB, *Day After Bloom*), poi a 60 gg, a 90 gg, e infine a 120 gg.

### **Gene CHS** (*calcone sintasi*)

Dagli esperimenti di amplificazione genica in tempo reale si è visto che la sequenza omologa alla calcone sintasi non risulta essere significativamente modulata. Si può notare infatti come i rapporti di espressione tra MRB e William (tab. 4.11) siano compresi sempre tra 2 e  $-0,5$ , cioè con un livello doppio o dimezzato. Dato che i rapporti, dopo essere stati trasformati in base logaritmica 2, sono compresi tra 1 e  $-1$  (figura 4.8) vengono considerati non significativamente modulati al fine di evitare errori di interpretazione causati dalla normale procedura di analisi in tempo reale della PCR.

**Tabella 4.11** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa calcone sintasi CHS

<b>DAB</b>	<b>rapporto d'espressione MRB/William</b>	<b>rapporto d'espressione in Log a base 2</b>
45	0.89558	-0.15910739
60	1.52151	0.60550483
90	0.74965	-0.41571941
120	0.56763	-0.81698675



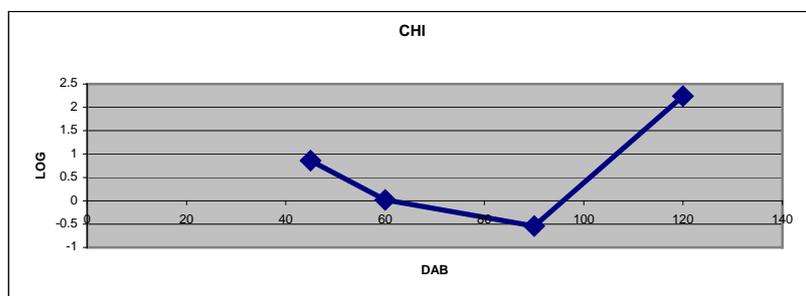
**Figura 4.8** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa CHS. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log<sub>2</sub> dei rapporti di espressione.

### Gene CHI (*calcone isomerasi*)

Gli esperimenti di espressione condotti sul frammento della calcone isomerasi mostrano non differentemente modulato tra le due varietà nei primi tre campionamenti (45, 60 e 90gg). Durante l'ultimo campionamento, 120 gg, si osserva una maggiore sintesi in MRB di quasi 5 volte rispetto a William (tab 4.12 e fig 4.9). Come vedremo in seguito questo è stato osservato anche per gli altri geni.

**Tabella 4.12** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa calcone isomerasi CHI

DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	1.8121	0.857668191
60	1.0142	0.020339272
90	0.6876	-0.540321511
120	4.7196	2.238655775



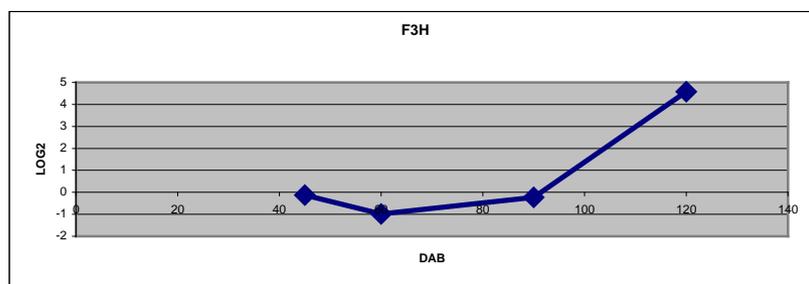
**Figura 4.9** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa CHI. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log<sub>2</sub> dei rapporti di espressione.

### Gene F3H (*flavone 3-idrossilasi*)

L'amplificazione del frammento di sequenza corrispondente alla *flavone 3-idrossilasi*, mostra un andamento piuttosto regolare per i tre campionamenti (45, 60 e 90gg) dove le due cultivar mostrano un profilo di espressione non significativamente diverso. Nel quarto campionamento (120gg) come nel caso precedente si osserva una maggiore sintesi in MRB rispetto a William di quasi 24 volte maggiore (tab 4.13 e fig 4.10).

**Tabella 4.13** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa flavone 3-idrossilasi (F3H)

DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	0.9127	-0.131779464
60	0.5075	-0.978460754
90	0.8527	-0.229857876
120	23.9837	4.583981448



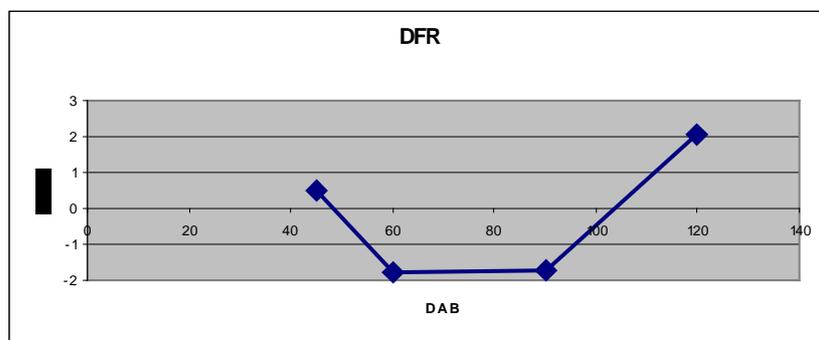
**Figura 4.10** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa F3H. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log2 dei rapporti di espressione.

### Gene DFR (*Diidroflavon\_reduttasi*)

L'espressione del frammento del gene putativo della diidroflavone reduttasi mostra un andamento simile a quello degli altri geni coinvolti a valle della via biosintetica delle antocianine. Nell'ultimo campionamento a 120 giorni dalla piena fioritura, la sua espressione è maggiore in Max Red Bartlett rispetto William di oltre quattro volte. A differenza degli altri geni si può notare come nel secondo e terzo campionamento (60 e 90gg) il gene DFR sia leggermente sotto-espresso in MRB rispetto a William (tab 4.14 e fig 4.11).

**Tabella 4.14** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa *Diidroflavon\_reduttasi* (DFR)

DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	1.4356	0.521672322
60	0.2874	-1.799064069
90	0.3089	-1.694986421
120	4.1686	2.059558247



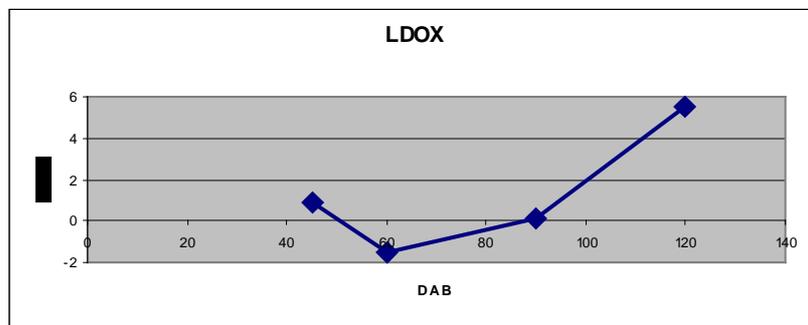
**Figura 4.11** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa CHI. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log2 dei rapporti di espressione.

**Gene ANS** (o LDoX, *Antocianidin sintasi*) e **UFGT** (*UDP-Glucosio: flavonol glucosiltransferasi*)

I frammenti di cDNA dei geni putativi di ANS (LDoX *Antocianidin sintasi*) e UFGT (*UDP-Glucosio: flavonol glucosiltransferasi*) danno un profilo di espressione praticamente identico tra loro (tab 4.15 e 4.16; fig 4.12 e 4.13). Interessante notare, l'incremento di espressione che si ha nell'ultimo campionamento (120 gg) di 46 e 42 volte superiore in Max Red Bartlett rispetto a William. Nei precedenti campionamenti l'andamento di espressione è del tutto simile agli altri geni. Si nota una leggera la sotto-espressione nel secondo campionamento (60 gg) per entrambi i geni. Nel primo campionamento (45 gg) si riscontra una sovra-espressione in MRB significativa solo per il gene UFGT. Entrambi nel terzo campionamento (90 gg), non sono differenzialmente modulati.

**Tabella 4.15** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa *Antocianidin sintasi* ANS (LDoX)

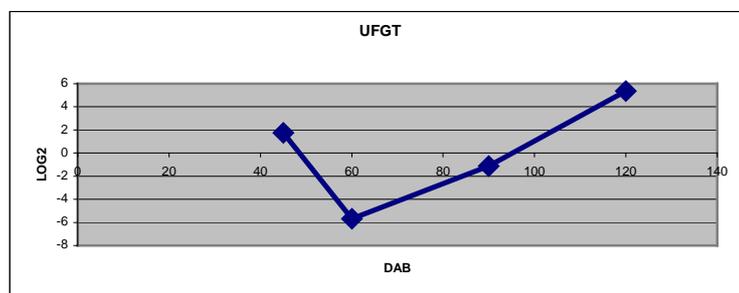
DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	1.806746	0.853393427
60	0.344932	-1.53561589
90	1.064392	0.090029189
120	46.121144	5.527356406



**Figura 4.12** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa ANS (LDoX). Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log<sub>2</sub> dei rapporti di espressione

**Tabella 4.16** Risultati di espressione qRT-PCR per la putativa *UDP-Glucosio: flavonol glucosiltransferasi* (UFGT)

DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	3.306823	1.725445829
60	0.350568	-1.512234064
90	1.267667	0.34217558
120	42.701028	5.416198891



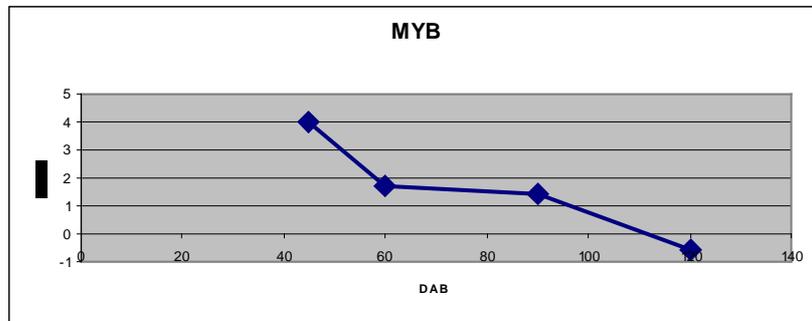
**Figura 4.13** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa UFGT. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log2 dei rapporti di espressione

### Gene Myb (*MyeloBlastosis*)

Il frammento della sequenza appartenente al gene putativo Myb ha un interessante espressione. Esso infatti viene sintetizzato ben 25 volte in più in Max Red Bartlett proprio nel primo campionamento (cioè a 45 giorni dopo la piena fioritura) quando si osserva una colorazione intensa del frutto (tab 4.17 e fig 4.14). Nei successivi campionamenti l'espressione cala mantenendo comunque un livello superiore nel frutto rosso rispetto a quello giallo e a 60 giorni e a 90 giorni dopo la fioritura. Infine nel quarto ed ultimo campionamento (120 gg) non si evidenziano differenze di espressione significative tra le due cultivar.

**Tabella 4.17** Risultati di espressione qRT-PCR per il putativo fattore di trascrizione Myb

DAB	rapporto d'espressione MRB/Will	rapporto d'espressione in Log a base 2
45	25.1366	4.010998622
60	3.3259	1.73373811
90	2.6438	1.402624455
120	0.6736	-0.570115587

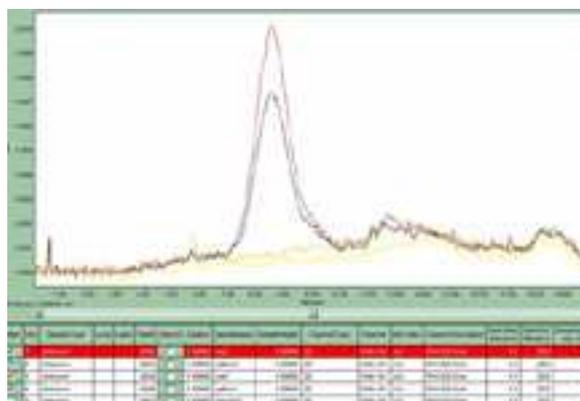


**Figura 4.14** Analisi di espressione qRT-PCR per la putativa Myb. Il grafico riporta in ascisse il numero di giorni dopo la fioritura (DAB) e in ordinate i valori in log2 dei rapporti di espressione

## Analisi fenotipica con LC-MS

Per identificare i composti flavonoidici specifici delle due cultivar sono state eseguite analisi in HPLC associate a spettrometri di massa. Sono stati utilizzati frutti allo stadio di raccolta commerciale corrispondente al quarto campionamento effettuato per le analisi di espressione genica (120 giorni dopo la fioritura).

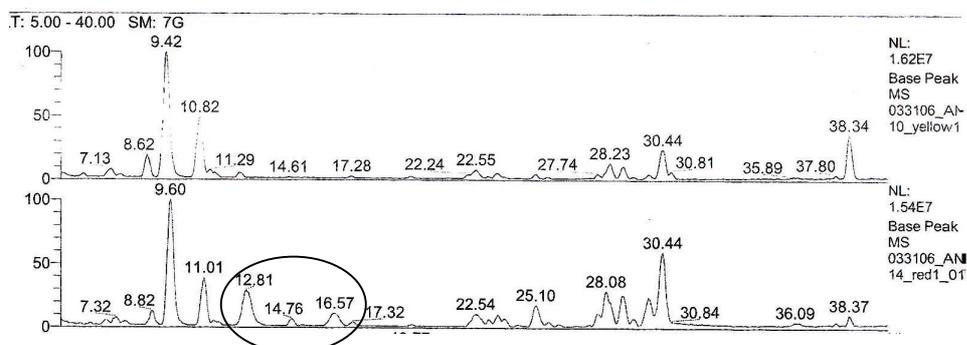
Le prime analisi sono state condotte solo in HPLC (High Performance Liquid Chromatographic). Questo al fine di verificare la possibilità di confronto fra gli spettri delle due cultivar. Nella figura (fig 4.15) è mostrato il diverso spettro delle due cultivar dove è evidente il picco presente in Max Red Bartlett ma assente in William. Questo risultato è stato ottenuto con campioni derivatizzati in cui l'aglicone del flavonoide è stato separato da gruppi chelanti come ad esempio gli zuccheri. L'assorbanza invece era settata a 520nm. Tale risultato è stato confermato ma con campioni non derivatizzati ma alle stesse condizioni di corsa.



**Fig 4.15 : Spettro di assorbimento a 520nm dopo corsa in HPLC.** Campioni derivatizzati di William (curve gialle) e Max Red Bartlett (curve rossa e nera)

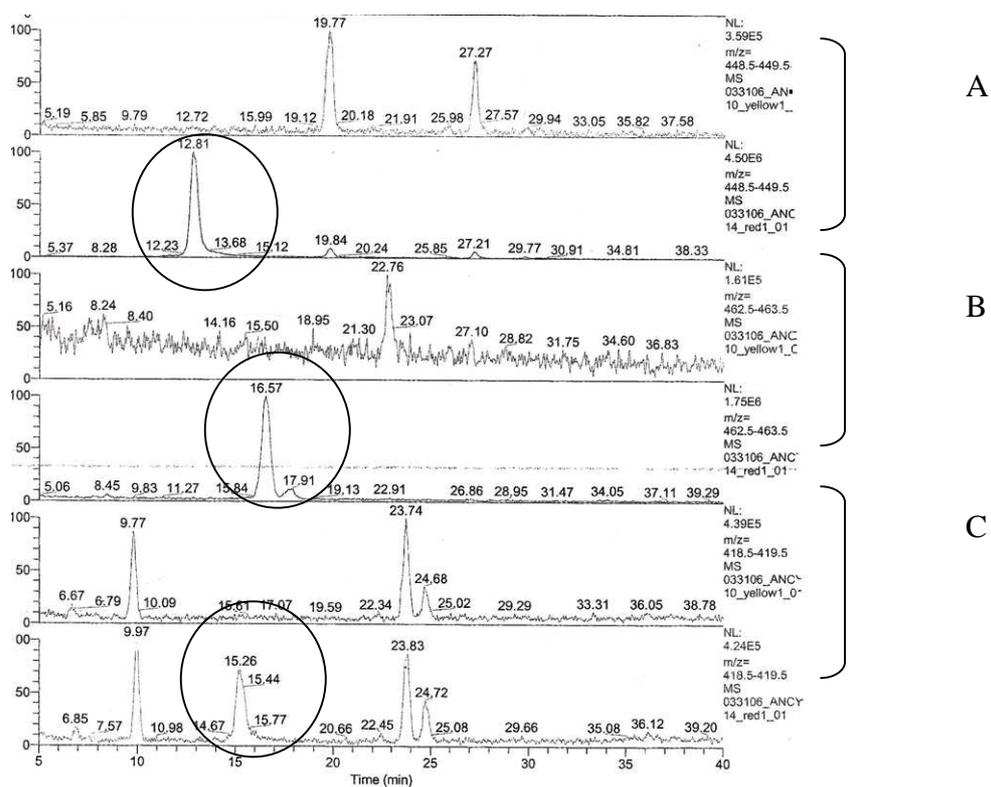
Al fine di identificare con il minor grado di incertezza, i composti antocianici presenti nell'epicarpo dei frutti a piena maturazione di Max Red Bartlett e assenti

invece in William, sono state svolte analisi in HPLC associate alla spettrometria di massa. Anche se le condizioni di corsa erano diverse a causa della diversa strumentazione usata, si è riusciti ugualmente ad individuare un serie tre picchi presenti nella cultivar rossa ma non in quella gialla (fig 4.16). Tali picchi, come mostrato in figura hanno un tempo di ritenzione di 12.81, 15.26 e 16.57 rispettivamente.



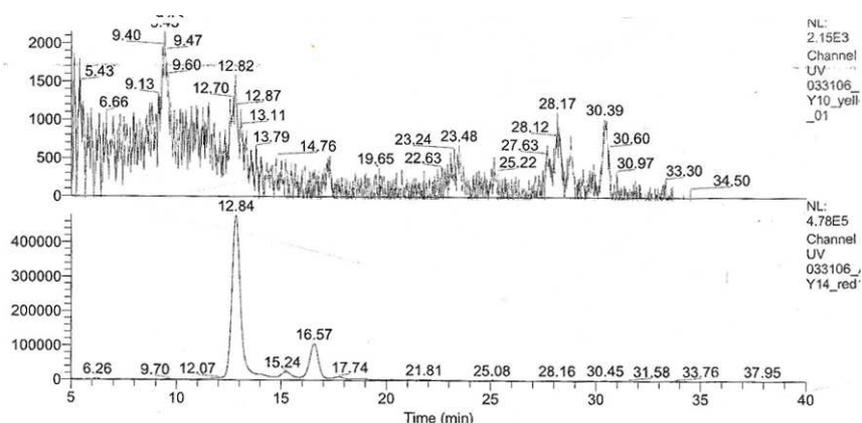
**Fig. 4.16 : Spettro totale (base peak MS) LC-HPLC.** William (sopra) ha un numero inferiori di picchi rispetto a Max Red Bartlett (sotto).

Nella figura 4.17 ogni singolo picco è evidenziato per il suo specifico peso molecolare indicato a destra di ogni singolo spettro.



**Fig 4.17 :Spettri specifici a determinati rapporti massa/carica. A: m/z 449; B: m/z 463; C: m/z 419. Ogni spettro evidenzia un singolo picco presente in Max Red Bartlett (sotto) e assente in William (sopra)**

Successivi esperimenti mostrano lo spettro di assorbimento a 520nm confermando la presenza degli stessi tre picchi al medesimo tempo di ritenzione. Tale risultato ha confermato le indicazioni precedenti (fig 4.18).



**Fig. 4.18 : Spettro di assorbimento a 520 nm dopo corsa LC-MS.** in alto lo spettro di William non mostra la presenza di picchi presenti invece in Max Red Bartlett, in basso.

Dopo uno studio in banca dati è stato possibile individuare con una certa precisione i tre composti elencati nella tabella successiva.

**Tab 4.18:** Elenco dei tre composti antocianici presenti in Max Red artlett ed assenti in William. È indicato inoltre il tempo di ritenzione, lo spettro di assorbimento, il rapporto massa/carica e il rapporto massa/carica dopo la seconda frammetnazione

<b>Composto</b>	<b>Tempo di ritenzione</b>	<b>UV spectrum</b>	<b>MS-ION</b>	<b>MS2</b>
<b>Cyanidine 3-o-galattoside</b>	12.84	520	449	287
<b>Cyanidine 3-o-arabioside</b>	15.24	520	419	287
<b>Quercitine 3-o-glucoside</b>	16.57	520	463	301

### **Analisi fenotipica con GC-MS**

Al fine di verificare che le uniche differenze tra William e il suo mutante Max Red Bartlett riguardassero solo il colore della buccia dei frutti e quindi i composti antocianici responsabili di tale fenotipo, sono state eseguite analisi di gas-cromatografia associate ad uno spettrometro di massa (GC-MS). Con questo tipo di analisi si è potuto verificare che a livello qualitativo i due frutti sono identici. Non sono state riscontrate infatti differenze né per quanto riguarda i vari tipi di zuccheri né per i composti volatili.

Tali analisi sono state condotte con due tecniche di gas-cromatografia diverse che prevedono anche due tipi di estrazione diversa come descritto nel capitolo 3. Le analisi dei composti zuccherini hanno rilevato in entrambe le cultivar una serie di zuccheri elencati in tabella 4.19. È interessante notare come anche a livello quantitativo gli zuccheri identificati diano gli stessi risultati in entrambe le varietà. Gli zuccheri maggiormente espressi sono il galattosio, il fruttosio, glucosio e inositolo.

**Tab 4.19 Composti trovati con analisi GC\_MS.** Composti zuccherini trovati nelle due varietà (William e MRB. Sono indicati anche i tempi di ritenzione di ogni singolo composto, il rapporto dell'area di ogni singolo composto con quella dello standard interno e la percentuale sul totale.

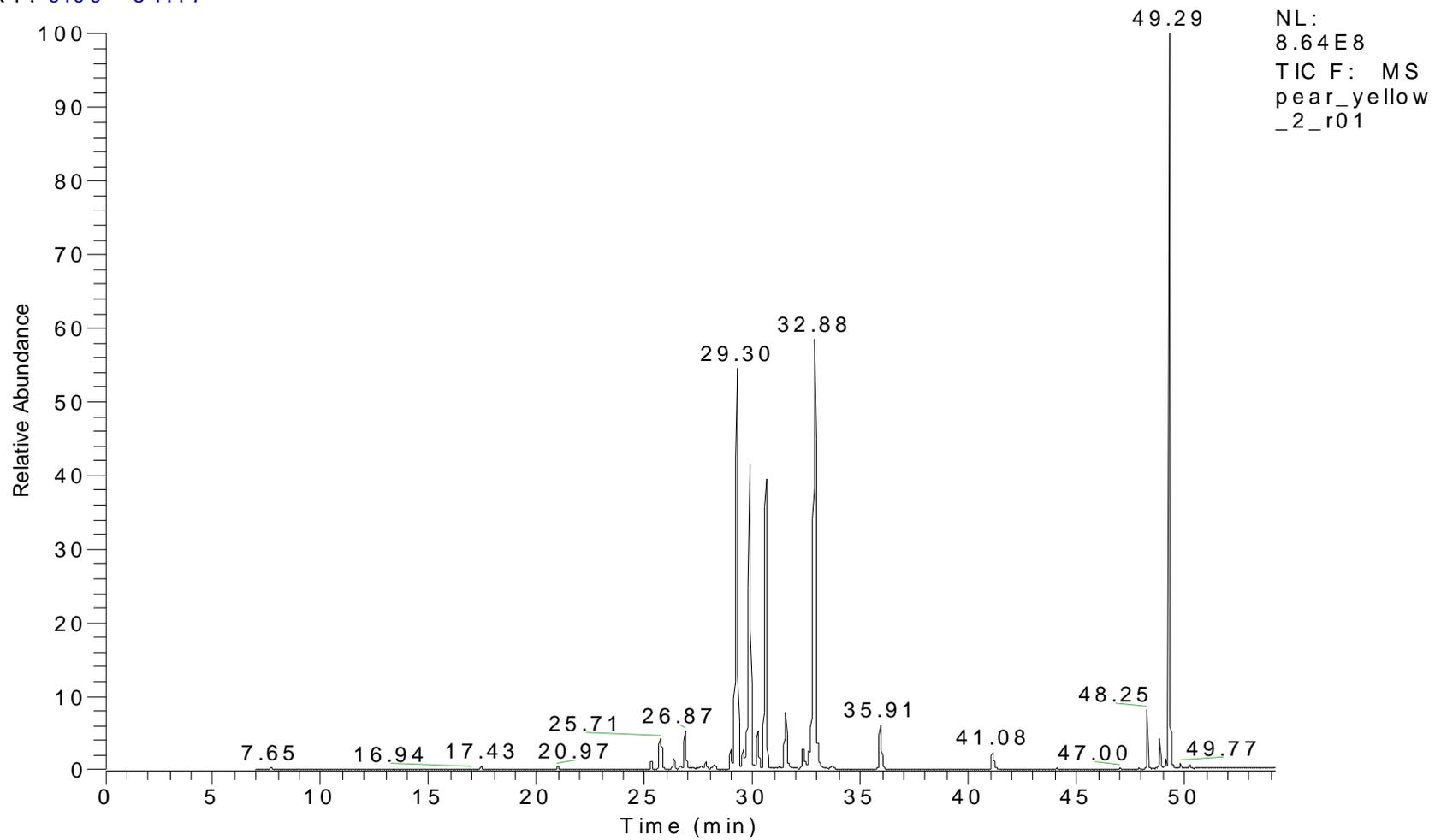
Nome Composto	Retention Time (rt)	yellow		red	
		area ratio	% ratio	area ratio	% ratio
phosphoric_acid	17.56	5.99	0.058	6.1	0.063
xylose1	26.53	3.56	0.034	3.218	0.033
xylose2	26.73	10.86	0.105	9.992	0.104
xylose3	26.88	20.24	0.195	18.537	0.192
int stad	28.23	0.00	0.000	0.00	0.000
sconosciuto	30.55	131.19	1.266	121.723	1.263
sconosciuto	30.83	14.00	0.135	12.308	0.128
sconosciuto	30.94	33.23	0.321	23.894	0.248
D-fruttosio2	31.32	868.63	8.383	705.72	7.321
D-fruttosio	31.51	730.83	7.053	698.001	7.241
Glucosio1	31.7	301.67	2.911	295.927	3.070
L_galattosio_meox-tms	31.81	6,008.84	57.992	5767.03	59.830
Glucose2	31.16	244.31	2.358	238.07	2.470
Mannitol2	32.37	17.21	0.166	14.646	0.152
Mannitol	32.48	86.20	0.832	78.578	0.815
D-sorbitol	32.62	1,008.87	9.737	804.876	8.350
Glucose3	33.47	420.12	4.055	410.251	4.256
Inositol	35.53	57.49	0.555	56.662	0.588
Saccarosio1	42.81	36.78	0.355	36.215	0.376
Saccarosio2	43.81	8.45	0.082	9.025	0.094
Saccarosio3	44.55	352.96	3.406	328.244	3.405

Le analisi per identificare i composti volatili sono state effettuate con il sistema di iniezione SPME. Entrambi gli spettri mostrano un profilo del tutto simile. Le analisi dei composti, fatte utilizzando la banca dati di proprietà della Virginia Bioinformatic Institute (VBI), hanno permesso di identificare i composti elencati in tabella 4.20

**Tab 4.20** elenco dei composti volatili identificati dopo analisi di HS\_SPME GC-MS

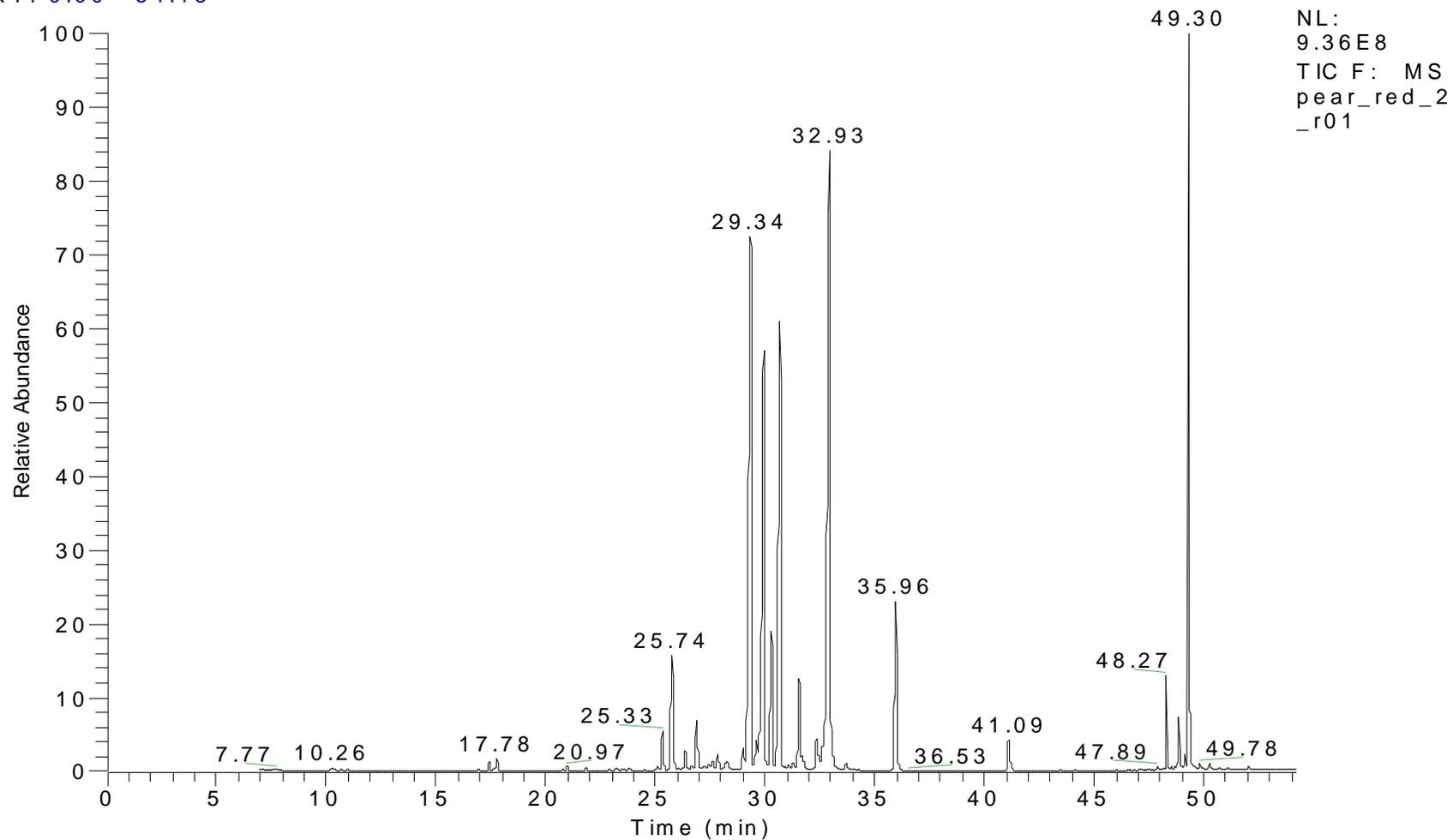
<b>Composto volatile</b>	<b>Tempo di ritenzione</b>
acetric acid hexylester	7.08
cyclopantasiloxane	9.06
benzoicacid_2_hydroxiy_ethilester	10.99
INT_STD	11.03
cyclohexsiloxane.dodecamethyl	11.44
alpha-copaene	13.55
methyl_[E,Z]-2,4decadienoate	12.68
ethy_2,4_(E,Z)-decadienoate	13.61
tetradecamethylcicloheptasiloxane	13.76
alpha_bergamotene	13.89
farnesene	14.07
delta_cadinene	14.34
9hexadecenoidacid._methyl_ester	18.52
hexadecanoid_acid_metyl_ester	18.78
9octadecanoid_acid_[z]_methyl_ester	20.47

RT: 0.00 - 54.17



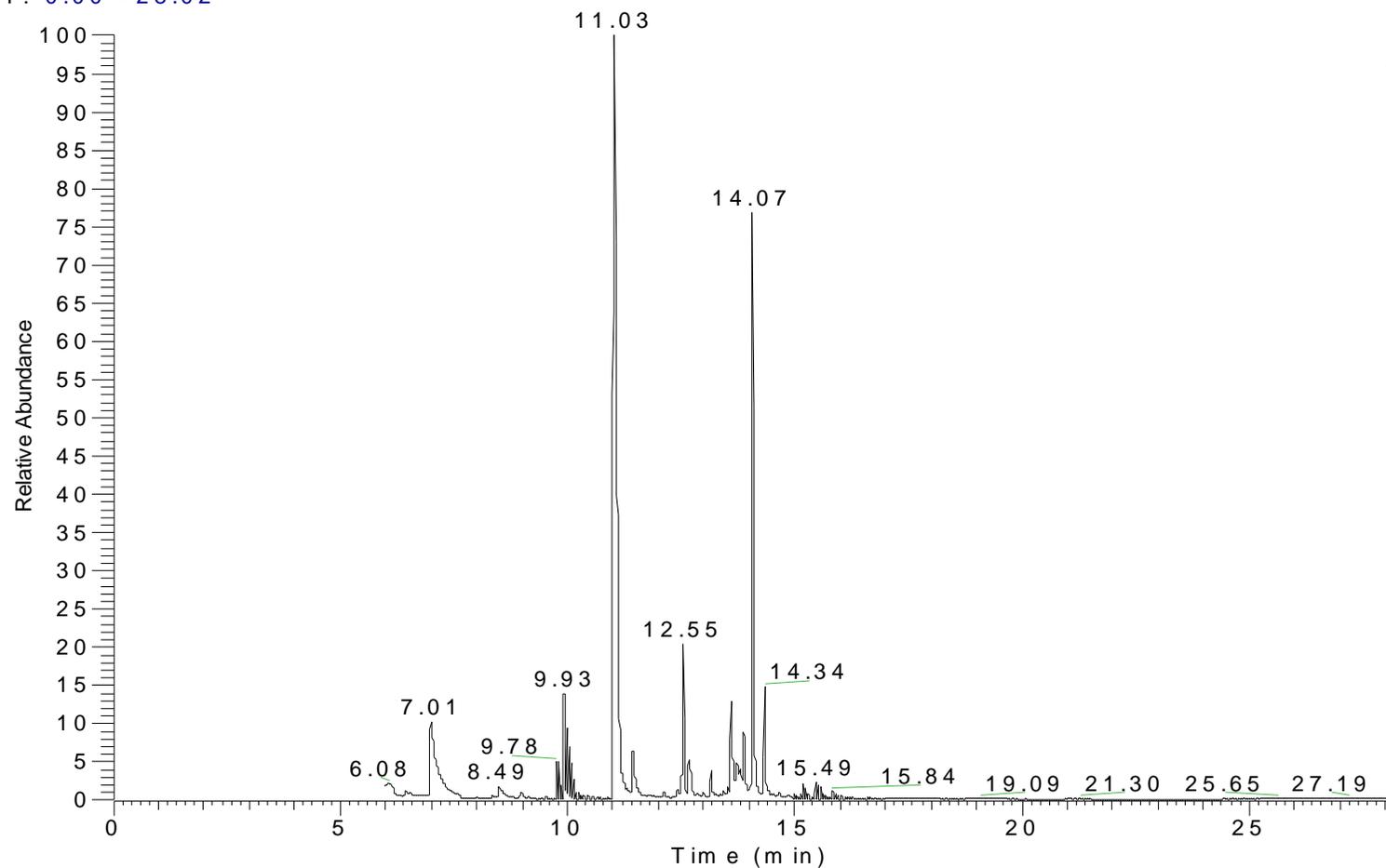
**Fig 4.19** Spettro di massa con gas-cromatografo di un campione di buccia della varietà William. Iniezione diretta per l'identificazione dei composti zuccherini

RT: 0.00 - 54.18



**Fig 4.20** Spettro di massa con gas-cromatografo di un campione di buccia della varietà Max Red Bartlett. Iniezione diretta per l'identificazione dei composti zuccherini

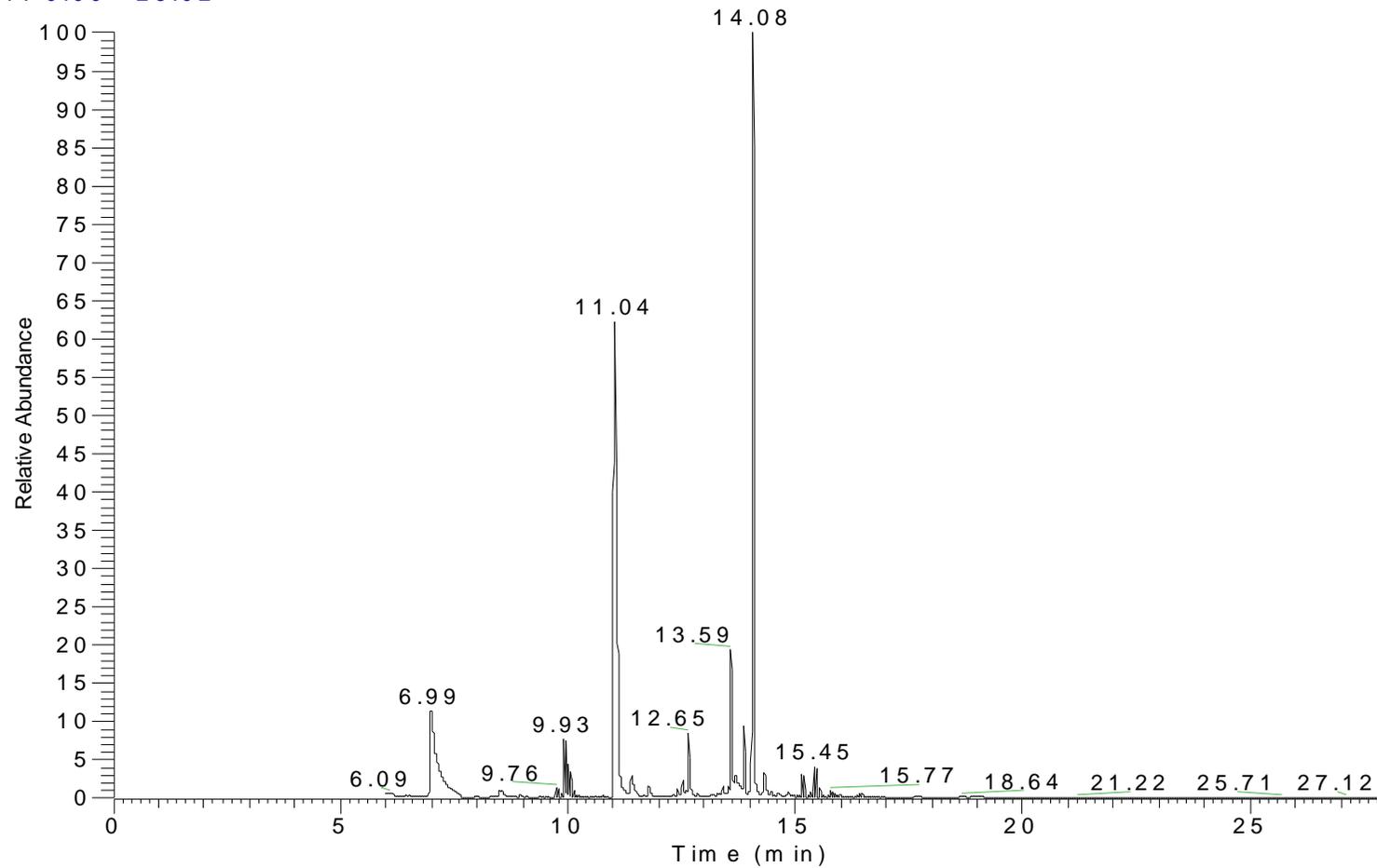
RT: 0.00 - 28.02



NL:  
6.70E8  
TIC F: MS  
pear\_yellow  
\_01

**Fig 4.21** Spettro di massa con gas-cromatografo di un campione di buccia della varietà William. Sistema di estrazione usato HS-SPME per l'identificazione dei composti volatili.

RT: 0.00 - 28.02



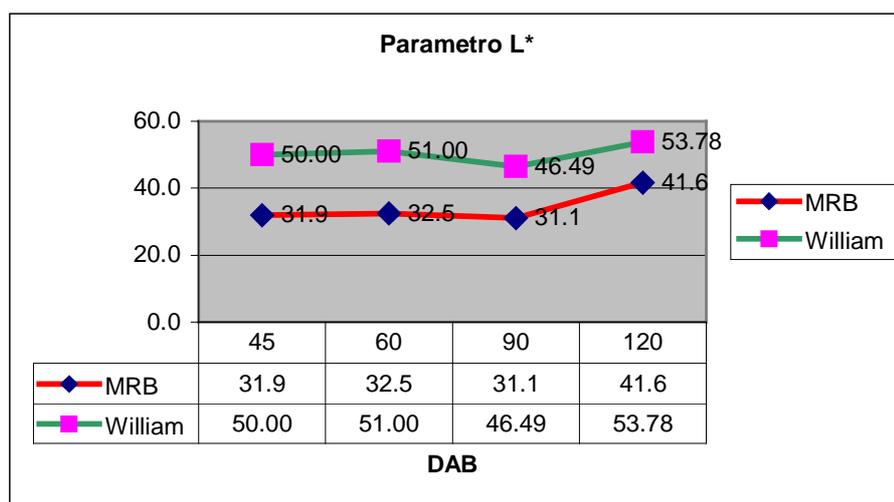
NL:  
1.32E9  
TIC F: MS  
pear\_red  
\_03

**Fig 4.22** Spettro di massa con gas-cromatografo di un campione di buccia della varietà Max Red Bartlett. Sistema di estrazione usato HS-SPME per l'identificazione dei composti volatili

## **DISCUSSIONE.**

## Valutazione delle analisi del colore dei frutti

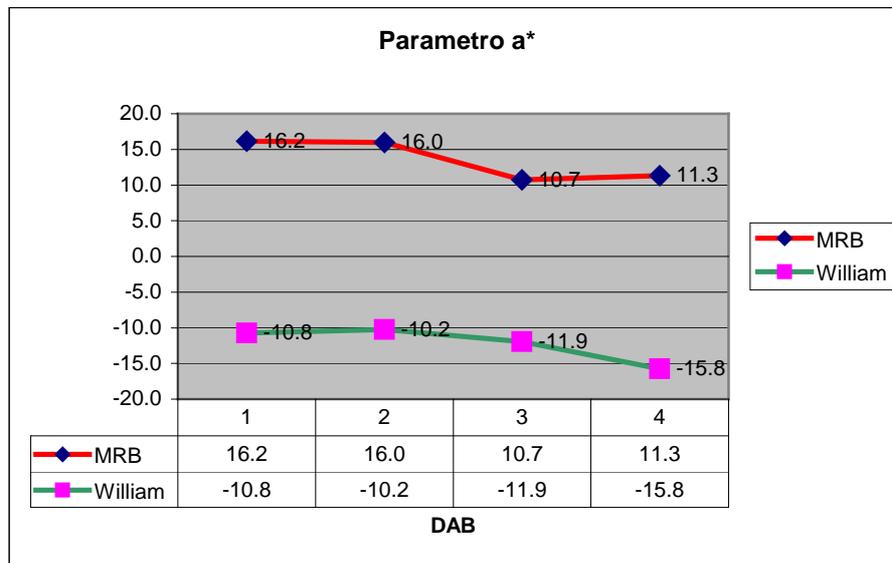
Sono state eseguite analisi del colore con il colorimetro Minolta CR300. Questi dati fenotipici avevano lo scopo di definire scientificamente il cambiamento del colore dell'epidermide dei frutti durante il periodo della loro maturazione. È evidente che il colore finale del frutto di William è giallo con bronzature rossastre sul lato rivolto al sole mentre per Max Red Bartlett (mutante di William) il colore finale è rosso striato. L'utilizzo comunque del colorimetro ha reso possibile la precisa quantificazione dei colori durante il periodo estivo della maturazione evitando stime soggettive. I grafici per i tre parametri L\*, a\* e b\* fissano la netta differenza tra le due cultivar.



**Fig 5.1** Grafico rappresentante l'andamento della luminosità L\*. La linea verde indica la cultivar William mentre la rossa MRB.

William è sempre molto più luminosa di Max Red Bartlett durante tutte le fasi di maturazione del frutto. Entrambe comunque hanno un andamento simile con una luminosità costante e priva di variazioni fino a 90 giorni dalla piena fioritura per poi aumentare nell'ultimo campionamento. Questa ultima fase è caratterizzata da cambiamenti sia nel colore sia nelle dimensioni del frutto, che indirettamente influiscono l'intensità del colore.

Il parametro a\* (+ rosso e - verde) non poteva che confermare la differente colorazione dei frutti tra le due cultivar.

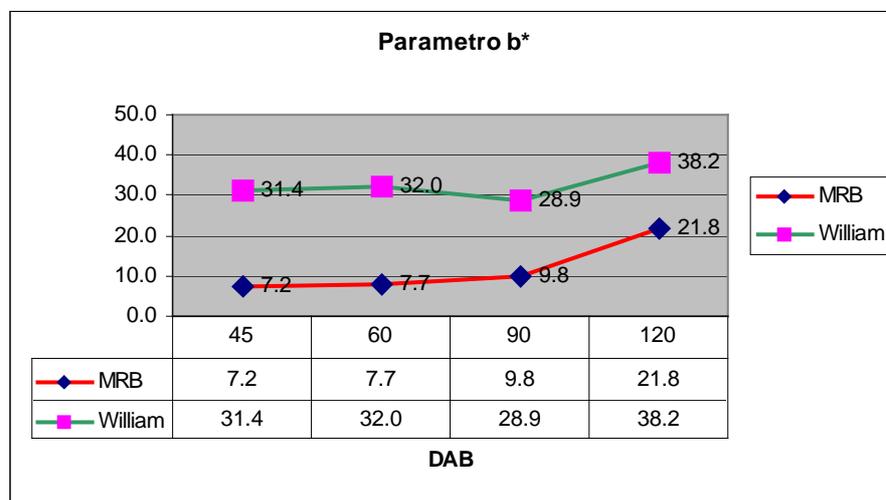


**Fig. 5.2** Grafico rappresentante l'andamento del colore rosso/verde a\*. La linea verde indica la cultivar William mentre la rossa MRB.

Max Red Bartlett infatti è caratterizzata da un rosso intenso con valori intorno a 16 nei primi due campionamenti (45 e 60 giorni dopo la piena fioritura). Tale colorazione cala poi nei successivi due campionamenti con valori che si attestano intorno a 10. Il frutto infatti presenta una colorazione più striata con un rosso meno acceso tendente quasi all'arancione. Questo è dovuto sia all'aumento delle dimensioni dei frutti sia alla sintesi di pigmenti gialli che determinano il colore di base giallo. È ipotizzabile infatti che il colore di base giallo, che caratterizza la cultivar William, sia coperto dal sovra-colore rosso di Max Red Bartlett causato dalla mutazione. William manifesta una colorazione verde durante tutto il ciclo di maturazione con valori intorno a -11. L'assenza di striature rosse è accentuato nell'ultimo campionamento raggiungendo il valore di -15.8.

Come per il parametro a\* anche il b\*, indicante il colore giallo, ha un andamento costante sia in William che in MRB, anche se il dato quantitativo del mutante è più basso. La differenza tra le due varietà è notevole ma

entrambe esprimono il colore giallo nella fase finale di maturazione, corrispondente all'ultimo campionamento. La mutazione quindi non agisce sul colore di base giallo che si esprime comunque in entrambe le varietà. In Max Red Bartlett il giallo è coperto dal sovra-colore rosso ma ha lo stesso una influenza rilevante nel colore finale. È per questa ragione che MRB ha una intensa colorazione rossa nelle prime fasi di sviluppo mentre al momento della raccolta il suo colore muta verso l'arancione, il quale è il risultato della mescolanza dei due colori (Fig 5.3).



**Fig. 5.3** Grafico rappresentante l'andamento del colore giallo/blu b\*. La linea verde indica la cultivar William mentre la rossa MRB

## **Sequenziamento dei geni coinvolti nella sintesi dei pigmenti antocianici**

La via biosintetica delle antocianidine è ben conosciuta in diverse piante modello come in *Arabidopsis*, petunia, bocca di leone, mais (Winkel 2001). Recentemente molti studi sono stati condotti in vite dove Kobayashi et al. (2004) hanno dimostrato che le cultivar bianche derivano dalla presenza di un retro-trasposone che inserendosi all'interno di una sequenza di un gene regolatore "Myb", blocca la via biosintetica che porta alla pigmentazione rossa. Molti altri lavori si sono susseguiti in una maggior comprensione del sistema regolativo della via biosintetica dei flavonoidi (Deluc et al. 2006; Castellarin et al. 2006). Per quanto riguarda il pero i lavori sono pochi e anche le sequenze trovate in banca dati erano solo per alcuni geni (CHS, DFR, ANS) della via biosintetica delle antocianidine (Fischer et al 2003). Le sequenze mancanti sono state ottenute con primer disegnati su specifiche sequenze di melo (Kim et al. 2003) sfruttando l'alta omologia tra le due specie. Recentemente Takos et al (2006) hanno pubblicato uno studio su un gene regolatore della famiglia Myb e ciò ha permesso di ampliare i nostri studi anche su questo gene. Infatti oltre ai sei geni coinvolti direttamente nella biosintesi degli antociani (CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, UFGT) è stato sequenziato anche quest'ultimo gene. L'altissima omologia di sequenza, anche a livello di introni, non ha permesso di individuare polimorfismi tra le varietà Abate Fetel e Max Red Bartlett, per nessun gene ad eccezione proprio del gene regolatore Myb. All'interno di tale sequenza infatti il polimorfismo prodotto da un microsatellite ha permesso il mappaggio del gene nel linkage group 9 in Max Red Bartlett e in Abate Fetel. Confrontando questo dato di mappa con quello del carattere morfologico rosso, mappato nel linkage group 4, si deduce che la mutazione non agisce direttamente sulla sequenza di questo gene regolatore, benché sia espresso maggiormente in Max Red Bartlett rispetto a William (vedi fig 4.14), ma agisca in un altro modo ancora da scoprire. Esistono oltre a Max Red Bartlett altre mutazioni rosse di William: Rosired,

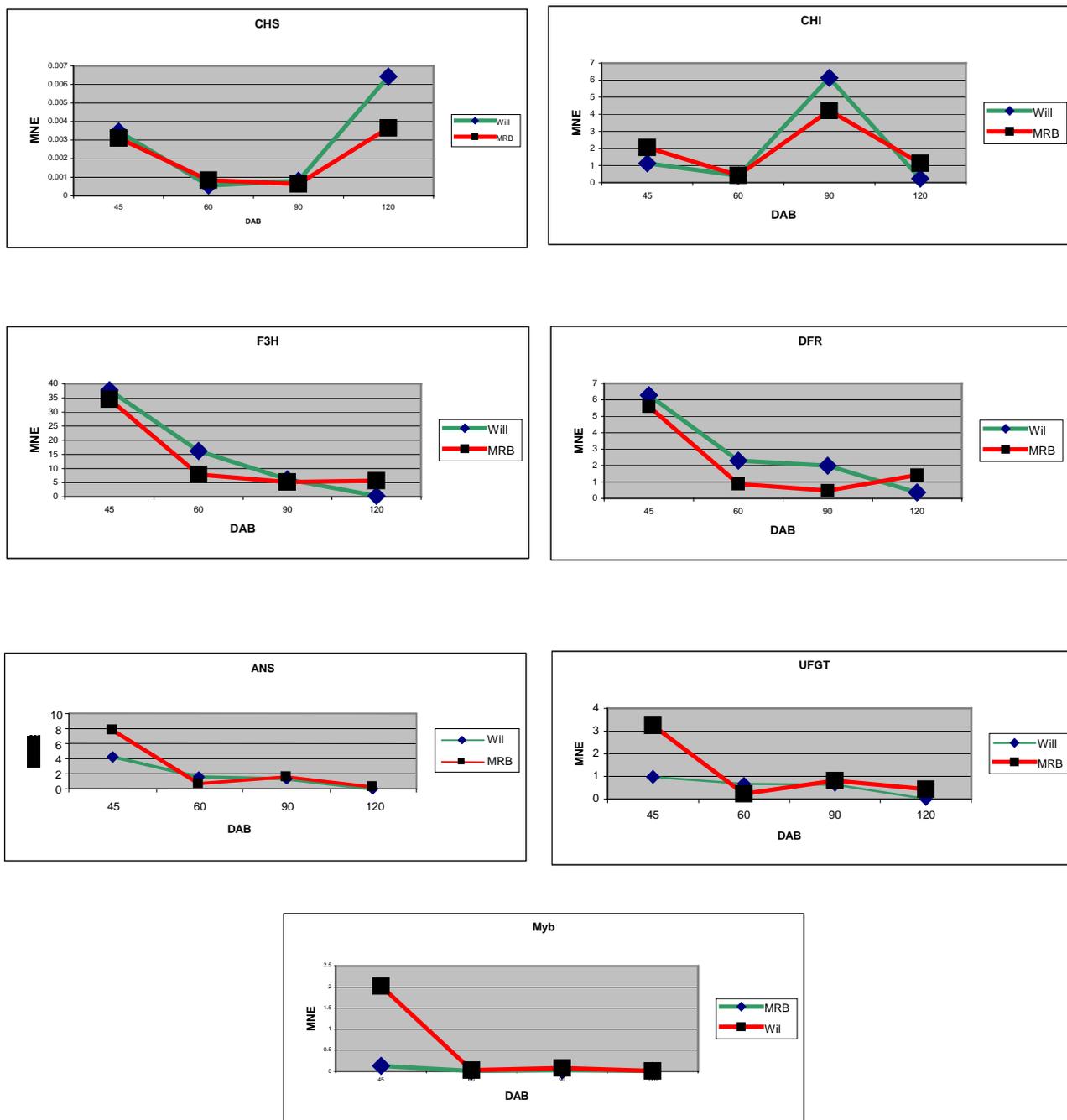
Sensation, e altre mutazioni derivate da esse. È interessante notare come queste varietà pur essendo rosse hanno un comportamento diverso rispetto a Max Red Bartlett. Rosired non mostra alcuna differenza fino a metà maturazione del frutto (intorno alla metà di luglio), dopodichè diventa di un rosso molto intenso che mantiene fino alla raccolta. Sensation invece ha un comportamento molto più simile a Max Red Bartlett ma la sua colorazione è decisamente meno intensa. Questo è spiegabile sulla base dell'esistenza di diversi sistemi regolativi della via biosintetica delle antocianine. Alcuni geni chiave di questa via biosintetica potrebbero essere silenziati dalla presenza di trasposoni che inserendosi o "saltando" possono inattivarli. Questa ipotesi sarebbe in linea anche con i risultati descritti da Kobayashi et al. (2004) in cui un retro-trasposone si inserisce proprio a monte della sequenza del gene Myb bloccando l'attività e producendo le cultivar bianche. Inoltre la mutazione in Max Red Bartlett è assai instabile con una alta possibilità di regredire nel corso di poche generazioni al fenotipo di William o in parte o in tutta la pianta. Tale instabilità è evidente anche con la comparsa di mutazioni settoriali che emergono spesso in alcuni frutti durante la maturazione. Nella figura 5.4 si possono vedere diversi gradi di regressione nel frutto di Max Red Bartlett.



**Fig. 5.4** Foto di 8 pere Max Red Bartlett con diversi gradi di regressione.

## **Espressione dei geni**

I primi studi condotti su melo per l'espressione dei geni coinvolti nella via biosintetica degli antociani sono stati eseguiti con analisi di northern blot (Honda et al., 2002; Kim et al., 2003). Questi primi risultati furono molto utili per conoscere le sequenze specifiche e per determinare il loro reale coinvolgimento nella sintesi delle antocianine. Risulta evidente anche che gli enzimi della via biosintetica delle antocianine siano indotti in modo coordinato durante lo sviluppo dei frutti di melo, infatti l'espressione dei geni codificanti gli enzimi è regolata da uno o poche proteine (fattori di trascrizione). Una di queste è stata scoperta recentemente anche in melo (Espley et al., 2007). Una proteina Myb con una espressione relativa molto elevata capace di indurre una pigmentazione rossa in foglie di tabacco con trasformazione transiente. I risultati ottenuti in questa tesi dimostrano che in pero l'espressione relativa del gene Myb codificante per una proteina regolatrice mostra una netta sovraespressione nel primo stadio di maturazione del frutto. Questa sovraespressione nel primo campionamento la si riscontra anche nei geni F3H, DFR, ANS e UFGT, direttamente coinvolti nella sintesi delle antocianine. Ma, mentre per il gene Myb l'espressione relativa in Max Red Bartlett è molto maggiore rispetto William, nei geni F3H e DFR l'espressione relativa nelle due varietà è dello stesso ordine di grandezza. Nel caso invece dei geni ANS e UFGT si riscontra un andamento più simile al gene Myb (Fig 5.5).

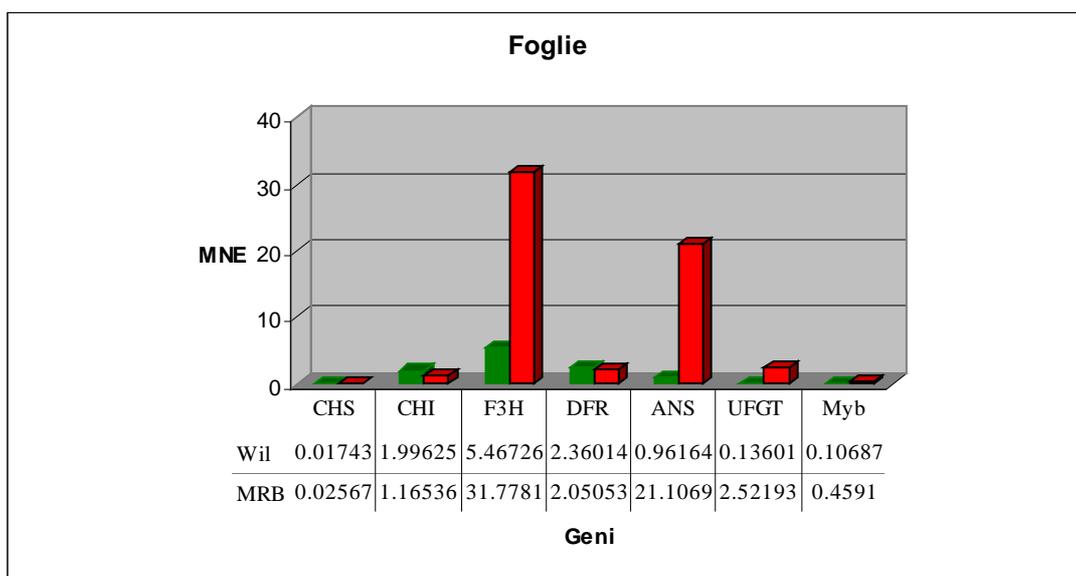


**Fig5.5** Grafici d'espressione relativa per i geni CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, UFGT, Myb normalizzati sull'espressione dell'actina per entrambe le varietà (rosso Max Red Bartlett, verde William)

Durante gli altri campionamenti (60, 90, e 120 giorni dopo la piena fioritura) l'espressione relativa di questi geni nelle due varietà si mantiene molto bassa. Questo è spiegabile ipotizzando che la trascrizione dei geni avvenga solo ad

inizio maturazione dei frutti e la sintesi dei composti antocianici dipenda esclusivamente da questa prima fase. Questo spiegherebbe anche la perdita di intensità e di colore al momento della raccolta. È interessante notare che viene confermata la coordinazione dei diversi geni sia in William che in Max Red Bartlett per i geni CHS, CHI, F3H e DFR in tutte le fasi di maturazione. Per gli altri due geni ANS e UFGT tale coordinazione viene mantenuta ma non nel primo campionamento, specialmente per quel che riguarda l'espressione di UFGT. È ipotizzabile quindi che l'azione del gene regolatore agisca direttamente su UFGT, la sua maggior espressione induca uno spostamento delle reazioni biochimiche a valle della via biosintetica che si riflette anche in una sovra-espressione del gene ANS. In conclusione potremmo ipotizzare che la mutazione accorsa in William agisca sull'attivazione del gene Myb, il quale a sua volta l'attivazione delle fasi finali della biosintesi delle antocianine.

Nelle foglie i risultati mostrano una maggiore complessità probabilmente dovuta al fatto che diverse famiglie o alleli potrebbero essere differenzialmente espressi nelle foglie rispetto alle bucce dei frutti (Espley et al. 2007). In questo caso si può notare come il gene DFR non mostra alcuna differenza di espressione tra le due cultivar mentre i geni F3H, ANS e UFGT e lo stesso gene regolatore Myb, siano decisamente sovra-espressi in Max Red Bartlett. Ma mentre per i geni F3h e ANS vi è una significativa presenza di trascritto, per i geni UFGT e Myb l'espressione è relativamente bassa. È ipotizzabile quindi che in differenti tessuti agiscano differenti forme dello stesso gene.

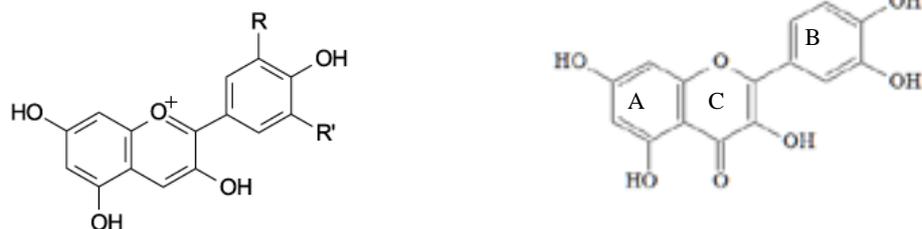


**Fig. 5.6** Grafico di espressione relativa per i geni CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, UFGT, Myb normalizzata su Actina. Sono riportati anche i valori per ogni singolo gene per entrambe le cultivar. Sull'asse delle ordinate è indicato il valore normalizzato d'espressione (Mean Normalized Expression)

## **Analisi fenotipiche**

L'accumulo dei pigmenti antocianici nei frutti di pera è un importante fattore di qualità. Oltre a giocare un importante ruolo fisiologico nell'interazione pianta animale ed avere funzioni difensive e di protezione contro gli stress luminosi (Harborne e Grayer, 1994; Koes et al., 1994), hanno anche effetti salutistici nell'uomo (Boyer and Liu, 2004). Gli antociani possono assumere diversi colori a seconda del numero di gruppi idrossilici sull'anello B, di zuccheri e di gruppi acilici (Harborne, 1967), del pH dell'ambiente in cui si trovano o dall'accumulo di specifici ioni metallo (Brouillard, 1988) o strutture cellulari (Noda et al., 1994).

Uno dei più comuni pigmenti antocianici è la cianidina che, presente sotto forma di cianidina 3-o-galattoside è il principale responsabile della colorazione rossa nella buccia delle mele (Lancaster, 1992; Tsao et al. 2003). Questo è stato confermato anche dai risultati ottenuti in questa tesi attraverso le analisi eseguite con LC-MS dove Max Red Bartlett (genotipo rosso), presenta questa molecola assente invece in William (genotipo giallo). Le analisi hanno anche rilevato la presenza di arabinosio in posizione 3 dell'anello 'c' al posto del galattosio e di una quercitina 3-o-glucoside appartenente al gruppo dei flavoni (l'ossigeno supplementare sull'anello centrale fa la differenza). Quest'ultimo composto è sintetizzato a partire dai di-idroflavononi grazie all'enzima flavonol sintasi (FLS) che non è stato studiato nelle analisi di espressione dei geni. È probabile comunque che tali molecole siano presenti in entrambe le specie e che l'attività delle glucosil-transferasi, maggiormente espressa in Max Red Bartlett, induca la glicosilazione di questa molecola.



**Fig. 5.7** Scheletro base della antocianina (a sinistra) e della quercitina a (destra)

Non sono stati invece rilevati flavonoidi presenti in William e assenti in Max Red Bartlett. L'attivazione della via biosintetica che porta alla sintesi dei pigmenti colorati non modifica il metabolismo secondario in maniera rilevante. Questo conferma anche i dati ottenuti con il colorimetro. Max Red Bartlett manifesta una colorazione gialla ma essa viene coperta dalla pigmentazione rossa. Questo sovrapporsi di pigmenti crea una colorazione tendente più all'arancione rispetto al rosso acceso specifico delle prime fasi di maturazione. La colorazione gialla probabilmente è data dai flavonoli che sono incolori o gialli e sono presenti nelle foglie e nei frutti per prevenire i danni dovuti all'assorbimento dei raggi ultravioletti. In autunno, quando la clorofilla si decompone, questi flavonoidi di colore giallo diventano visibili. Nelle foglie invece i flavonoli incolori vengono privati dell'atomo di ossigeno attaccato all'anello centrale e si convertono in antocianidine che hanno colori brillanti. Questa trasformazione chimica, che consiste solo nella perdita di un atomo di ossigeno, è responsabile della nostra percezione del colore dell'autunno.

La stabilità degli antociani ed in particolare delle antocianidine può essere dovuta a moltissimi fattori. Sia chimici (glicosilazioni, metilazioni, acilazioni) ma anche ambientali come il cambiamento di pH. È probabile che in pero le antocianidine rilevate dalle analisi di LC-MS siano frutto esclusivamente della sintesi avvenuta nelle prime fasi di maturazione, a differenza di altre specie, come ad esempio nella vite, dove l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi

degli antociani è presente dall'invasatura (viraggio del colore) fino alla raccolta. In pero non si riscontra un significativo livello di espressione di tali geni dopo 60 giorni la piena fioritura e questo indica che i flavonoidi nelle bucce di pero siano stabili e non si degradano.

Le analisi di gas-cromatografia hanno confermato che da un punto di vista qualitativo di composti zuccheri e volatili i frutti di William e di Max Red Bartlett non mostrano differenze. L'azione mutagenica che agisce direttamente sulla via biosintetica delle antocianine non ha effetti indiretti su altre vie biosintetiche del metabolismo secondario tali da indurre un cambiamento qualitativo di questo tipo. Fino ad oggi l'unica differenza riscontrata è una differenza tempo di raccolta tra le due cultivar di circa 3-4 giorni. Questo è facilmente comprensibile dal fatto che la colorazione rossa agisce da schermo sulla clorofilla e quindi meno energia viene assorbita dal frutto il quale si svilupperà leggermente più lentamente.

## Conclusioni

La ricerca condotta in questo lavoro di tesi ha utilizzato un approccio multidisciplinare per studiare e caratterizzare la mutazione della cultivar William che induce un cambiamento nel colore dell'epicarpo (da giallo a rosso) nel suo insieme.

Questo tipo di indagine rappresenta un passo in avanti nella comprensione del metabolismo secondario e delle sue interazioni. Inoltre, dal punto di vista applicativo, questi risultati faciliterebbe in programmi di miglioramento genetico tradizionali.

L'attività di ricerca può essere riassunta come segue:

- ◇ è stato studiato il colore nei frutti e nelle foglie di William e Max Red Bartlett. In particolare nei frutti è stato studiato con un colorimetro l'evoluzione del colore durante la maturazione.
- ◇ il carattere "colore rosso" è stato mappato nella mappa molecolare di Max Red Bartlett nel linkage group 4. Questo testimonia anche che la mutazione è ereditabile e non si tratta di una chimera.
- ◇ sono stati sequenziati sia i geni delle due cultivar coinvolti nella via biosintetica delle antocianine sia un fattore di trascrizione "Myb" che probabilmente è coinvolto nel sistema regolativo della via biosintetica.
- ◇ tali geni non hanno mostrato polimorfismo all'interno delle diverse varietà di pero prese in esame (William, Max Red Bartlett e Abate Fétel). L'altissima omologia è stata confermata anche tra melo e pero dove al massimo si sono trovate mutazioni puntiformi. Solamente il fattore di trascrizione "Myb" presentava un polimorfismo. Questo ha permesso il suo mappaggio nel linkage group 9 sempre della stessa mappa molecolare di Max Red Bartlett.
- ◇ i profili di espressione mostrano una sovra-espressione soprattutto per il gene UFGT e il gene regolatore Myb. Questo si verifica solo nelle prime

fasi di sviluppo del frutto, proprio quando è maggiore la differenza di colore tra le due varietà. Il ruolo centrale del gene “Myb” è in analogia con quello descritto in altre specie (es: vite Kobayashi et al. 2004).

- ◇ La mutazione regredisce spesso nel fenotipo originario e può coinvolgere l'intera pianta o parte di una pianta. Anche il frutto può essere soggetto ad una regressione parziale o totale.
- ◇ La natura instabile della mutazione lascia intendere che sia dovuta ad un trasposone altamente mobile, il quale può bloccare o attivare la via biosintetica dei pigmenti antocianici. Questo sarebbe in accordo anche con quanto scoperto in vite dove un retro-trasposone si è inserito a monte di un gene regolatore.
- ◇ È probabile che oltre al gene regolatore “Myb” in parte sequenziato e mappato nel linkage group 9, sia presente un altro fattore di trascrizione nel linkage group 4, dove è stata mappato il “carattere rosso” come carattere morfologico
- ◇ I dati fenotipici di spettrometria di massa associata hanno permesso di identificare tre pigmenti (Cyanidine 3-o-galattoside, Cyanidine 3-o-arabinoside, Quercitine 3-o-glucoside) differentemente sintetizzati in Max Red Bartlett e in William.
- ◇ Le analisi condotte con gas cromatografo associate a spettrometro di massa hanno confermato che la mutazione coinvolge soltanto il colore della buccia ma non altera la sintesi di altri composti zuccherini o volatili. Quindi le caratteristiche gustative rimangono invariate.

## Letteratura

- Bell R., Quamme H.A., Layne R.E.C., Skirvin R. (1996). Pears. Fruit Breeding, Volume I.
- Bu'lock J.D., 1965 The biosynthesis of natural products. P.1. McGraw-Hill, London
- Bate –Smith E.C., 1984 Age and distribution of galloyl esters, iridoids and certain other repellents in plants. *Phytochemistry*, 23:945-950
- Beart J.E., Lilley T.H., Haslam E., 1975 *Phytochemistry of proanthocyanidins. Phytochemistry*, 14:1107-1113
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S (2004) The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *PNAS* 101:886– 890
- Birnboim HC, Doly J. 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24;7(6):1513-23
- Bornman 2000 Role of plant phenolics in UV-protection. *Polyphenols Communications* 2000, Freising-Weihenstephan, September 11-15
- Brouillard, R. (1988) Flavonoids and flower colour. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980* (Harborne, J.B., ed.). London: Chapman & Hall, pp. 525–538.
- Brown J.E., Khodr H., Hider H., Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoids interactions with Cu<sup>++</sup> ions; implications for their antioxidant properties. *Biochem J.*, 330, 1173-1178. 82
- Buffoni Hall R.S., Bornman J.F. and Bjorn L.O. 2000 UV-absorbing phenolics compounds in lower terrestrial plants. *Polifenols Communicatioins* 2000, Freising-Weihenstephan, semptember 11-15
- Castellarin S.D., G. Di Gaspero, R. Marconi, A. Nonis, E. Peterlunger, S. Paillard, A.F. Adam-Blondon and R. Testolin 2006 Colour variation in red

- grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin *Genomics* 7:12 1-17
- Cheeseman K.H. and Slater T.F. 1993 An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49, 481-493
- Cooper-Driver, 2001 Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56. 229-236
- Das N.P. and Pereira T.A. 1990 Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure activity relationship. *J. of Americ. Oil Chemists Soc.* 67, 255-258
- Deluc L., F. Barrieu, C. Marchive, V. Lauvergeat, A. Decendit, T. Richard, J.P. Carde, J.M. Mérillon and S. Hamdi 2006 Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway1 *Plant Physiol.* February; 140(2): 499–511
- Dillon V.M., Overton J., Grayer R.J., Harborne J.B 1997 Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. *Phytochemistry* 27, 2801-2805
- Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F., Chiodini R., Tartarini S., Bazzi C. and Sansavini S. ( 2004 ). Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear ( *Pyrus communis* L. ) genetic linkage map. *Molecular Breeding* 14, 407-418.
- Dong, Y.H., Mitra, D., Kootstra, A., Lister, C. and Lancaster, J. (1998) Postharvest stimulation of skin colour in Royal Gala apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120, 95–100.
- Elstner E.F., Obwald W.F., Volpert R. and Schempp H., 1994 Phenolics antioxidants. *Acta Horticulturae* 381, 304-335
- Espley R.V., R.P. H.J. Putterill, D.E. Stevenson, S. Kutty-Amma and A. C. Allan 2007 Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB

- transcription factor, MdMYB10 *The Plant Journal* 49, 414–427
- Figueiredo P., Elhabari M., Toki K., Saito N., Dangles O., Bruillard R., 1996  
New aspect of anthocyanin complexation. Intramolecular co-pigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* 41 (1), 301-308
- Fischer TC, Halbwirth H, Meisel B, Stich K, Forkmann G 2003 Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Arch Biochem Biophys* 412: 223-230
- Forkmann M. and Martens S., 2001 Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current opinion in biotechnology*, 12: 155-160
- Gottlieb O.R., 1989 The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. *Phytochemistry*, 28:2545-2558
- Gottlieb O.R., 1990 Phytochemicals: differentiation and function *Phytochemistry*, 29:1725-1724
- Goto T., Tamura H., Kaway T., Hoshino T., harada N., Kondo N. 1986  
Chemistry of metalloanthocyanins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 471, 155-173
- Goodwin 1998 *Plant pigments*. Accademic Press, London.
- Grayer R.J., Kimmins E.M., Padgham D.E., Harborne J.B., and Ranga Rao D.V. 1992 Condensed tannin levels and resistance of groundnuts against *Aphis craccivora*. *phytochemistry* 31, 3795-3800
- Grayer R.J., Harborne J.B., Kimmins E.M., Stevenson, F.C. and Wijayagunasckera H.N.P., 1994 Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Acta Horticulturae* 381, 241-242
- Harborne J.B., 1967 *Introduction to ecological biochemistry*, p.2. Academic press, London

- Haslam E., 1995 Fruit and flower pigmentation. Rev. Prog. Coloration 25, 18-28
- Heimler D., Pieroni A., Cimato A., and Sani G. 2000 UV-filter effect of green gousse on flavonoid content of olive leaves. Polyphenols Communications 2000, Freising-Weihenstephan, September 11-15, 2000, pp605-606
- Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, Yoshida H, Ozeki Y 2002 Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). Plant Cell Physiol.43(5):578-85.
- Janzen D.H., 1969 Coevolution. Science 165, 415:416
- Kim SH, Lee JR, Hong ST, Yoo YK, An G, Kim SR 2003 Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. Plant Sci 165: 403-413
- Kobayashi S. N.G.Yamamoto, H. Hirochika 2004 Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. Science Vol. 304. 5673, p. 982
- Koganov M.M., Dueva O.V., Tsorin B.L., 1999 Activities of plant derived phenols in fibroblast cell culture model. Journ. Of Natural Products 62, 481-483
- Lancaster, J. (1992) Regulation of skin color in apples. Crit. Rev. Plant. Sci. 10, 487–502.
- Li F, Jin Z, Qu W, Zhao D, Ma F. 2006 Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem. 44(7-9):455-61
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C.D., Tarchini R., Van De Weg E. and Gessler C. ( 2002 ). Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple ( *Malus x domestica* Borkh. ). Molecular Breeding 10, 217-241.

- Miyase T., Sano M., Nakai H., Muraoka M., Nakazawa M., Suzuki M., Yoshino K., Nishiara Y., Tanai T. 1999 Antioxidant from *Lespedeza homoloba*, I. Phytochemistry 52, 303-310
- Miyase T., Sano M., Yoshino K., Nonaka 1999b Antioxidant from *Lespedeza homoloba*, II. Phytochemistry 52, 311-319
- Musacchi S., Ancarani V., Sansavini S. 2006 Qualità e resistenza alle malattie nei programmi di miglioramento genetico a Bologna. Frutticoltura 10 20-23
- Negri P., L. Cantoni, L. Manzecchi 1998 Effects of hormonal conditioning of pear leaf explants on agrobacterium-mediated transformation efficiency
- Noda, K.-I., Glover, B.J., Linstead, P. and Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. Nature, 369, 661–664.
- Paul N. 2001 Plant responses to UV-B: time to look beyond stratospheric ozone depletion? New phytologist 150: 1-8
- Patocchi A., Walser M., Tartarini S., Broggin G.A.L., Gennari F., Sansavini S. and Gessler C. ( 2005 ). Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm. Genome 48, 630-636.
- Pfaffl M.W. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 1;29(9):e45
- Pelletier MK, Burbulis IE, Winkel-Shirley B. 1999 Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in Arabidopsis seedlings. Plant Mol Biol. 40(1):45-54.
- Pierantoni L., Cho K.-H., Shin I.-S., Chiodini R., Tartarini S., Dondini L., Kang S.-J., Sansavini S. ( 2004 ). Characterisation and trasferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. Theor Appl Genet 109, 1519-1524.

- Pierantoni L., L. Dondini, K.-H. Cho, I.-S. Shin, F. Gennai, R. Chiodini, S. Tartarici, S.-J. Kang, S. Sansavini (DOI 10.1007/s11295-006-0070-0) Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map. *Tree Genetics & Genomes*.
- Predieri S. 1997 Dalla mutagenesi alberi ad habitus compatto per impianti di pero ad alta densità. *Frutticoltura* 3:49-51
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF 2003 Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 13;339(1):62-6
- Reddy AR, Scheffler B, Madhuri G, Srivastava MN, Kumar A, Sathyanarayanan PV, Nair S, Mohan M. 1996 Chalcone synthase in rice (*Oryza sativa* L.): detection of the CHS protein in seedlings and molecular mapping of the chs locus. *Plant Mol Biol*. 32(4):735-43
- Rice-Evans C., Miller N., Pagana G. (1996) Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20 933-956
- Rice-Evans C. and Spencer J., 2000
- Rios J.L., Manez S., Paya M., Alcazar M.J., 1992 Antioxidant activity of flavonoids from *Sidetitius javalambrensis*, *Phytochemistry* 31, 1947-1950
- Rivalta L., Dradi M. 1998 Miglioramento genetico del pero presso l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Forlì. *Frutticoltura*, 9:51-57
- Shahidi F., Wanasundara P., Hong C., 1991 Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model system. In *ACS Symposium Series 506*, Am. Chemical Soc., Washington DC, pp214-222
- Schnitzler J.P., Jungblut T.P., Helleer W., Langerbartels C., Kofferlein M., Sandermann Jr., 1994 Effects of ozone and UV-B radiation on scots pine. *Acta Horticulturae* 381, 463-469
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg WE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F,

- Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh) genome. *Tree Genet Genomes* 2: 202–224
- Stafford H.A., 1990 *Flavonoid metabolism*, CRC Press, Boca Raton, pp 298
- Takeda K., Yanagisawa M., Kifune T., Kinoshita T., and Timberlake C.F. 1994 A blu pigment complex in flower of *salvia patens*. *Phytochemistry* 35, 1167-1169
- Takos AM, Ubi BE, Robinson SP, Walker AR (2006) Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Sci* 170: 487-499
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. and Zhu, H. (2003) Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51, 6347–6353.
- Wang S.F., Ridsdill-Smith T.J. Ghisalberti E.L. 1999 Levels of isoflavonoids as indicators of resistance of subterrean clover to red legged earth mite. *Journal of chemical Ecology* 25, 795-803
- Winkel J.S.B., 2001 *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology.* *Plant Physiology* 126, 485-493
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T., Matsuta N. (2001). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl Genetic* 102, 865-870.
- Yamasaki H., 1997 A function of color. *Trends in Plants Science* 2, 7-9
- Zobel A.M, Chen Y. and Brown S.A. 1994 Influence of UV on furanocumarins in *Ruta graveolens* leaves. *Acta Horticulturae* 381, 344-359

## **Allegato A**

### **CHS AF494401.1**

TCTTGTGGGTCAAGCCTTGTTTGGTGACGGTGCAGCGGCCGTCATT  
ATTGGTGCCGACCCAATGCCTGAAGTCGAGAAGCCCTTGTTTGAAT  
TGGTCTCGGCGGCACAAACCATTATCCCCGACAGTGATGGGGCTAT  
TGACCTACATCTTCGTGAAGTAGGGCTCACGTTTCACCTTCGGAAG  
GACGTTCCCGAGCTTATTTTCGAAGAACATCGAAAAGAGCCTTAACG  
AGGCCTTCAAGCCTATAGGCATTTTCGGATTGGGACTCGCTCTTCTG  
GATTGCACACCCAGGTGGCCGTGCTATTCTGGACCAAATAGAGGCC  
AAGTTGGCATTGAAGCCAGAGAACTAGAAAGCGACAAGGCAAGTG  
T

### **CHI 1 AF494400.1**

AGTTTCGGAGAATTGCGTTGCCTTTTGGGAAGTCAGTCGGAATTTAC  
ACTGATGCAGAAGGCAAAGCCATTGAAAAGTTCCTTGAGGTCTTCA  
AAGATCAAAACTTCCCACCCGGCGCCTCCATTCTTTTCACGCAATCT  
CCCAAAGGATCGCTAACGGTTGGTAATCCTACTTTTGGATGGTTAG  
TTCTGTAGTTTACATCGGATTTTTGACATCTTCCCTCTCGCTTTCGC  
CACAGATTAGCTTCTCTAGAGATGCATCCGTACCTGAAGCTGCAAA  
CGCGGTGATAGAAAACAACTACTTTCCGAGGCAGTTCTAGAGTCG  
ATCGTTGGAAAGCACGGTGTTCGCCTGGATCAAAG

### **F3H AF497633.1**

TTTCTACCCAAAATGCCCTCAGCCCGACCTAACCCTTGGCCTCAAG  
CGCCATACCGACCCGGGCACAATTACCCTTCTGCTTCAAGACCAAG  
TTGGGGGCCTCCAGGCTACTCGGGATGATGGGAAAACGTGGATCA  
CCGTTCAACCAGTGGAAGGAGCTTTTGTGGTCAATCTTGGAGATCA  
TGGTCATGTGAGTAAACACTACATAATTTTATAATTAACCTTGCAA

TTTACAATTACTTTTTTTGGCTCGAACATAAACAGTTTTATTAGAACG  
TTACAAAGTTGGTGCATAAATAAAATTATATTTAGGGATGTGATAT  
TCACATAACCATTTTTTTACTTCTCACATACCTTTTTAATTTTCGGCCA  
TCGGATCGGATGAATTGAATAAGGTCAAATGACATAAATTAATAA  
GAGGTGTGTAAGAAGTAAAAAGAAGTGTGTGGATAGCACACCCCC  
TATATTTATAACAATTGTTAGCATGGTAATTGTTTCAAGGTCGTAC  
ATAATGGAATTATATTATCTCTATACATTTTTTCAGTTTTTTTTTGTTAA  
AATTATAGAGGTGCTCGCTTGTCTTTTAAAAAACTAAATAAAATGG  
GTATGTCCATATGACGATGGTGGTGGGCAAATGTCATTTTCTTCAT  
GTGAATAAGCAAGATAGGGACGTATATATATTTGCTTAGTATTATT  
AAGTATTTAATTTCTATTTTATTATTCATATATTTAATAATTGGTTG  
AAATTTGATGGAGCTATTGATTATTATTTATAAGTAATTAAGAAA  
TTAAAAACCAGTAAAAAGTTGAGTAAATAACTGGTTATACGGGGTT  
TTCTCTAGTACATAACAACGCACATTTTATCCACCACCTGCGGTGTA  
CTGTTGGCAATTGACATTGAATCTCACATTTATATCTTAAGCGTGAG  
ATTCATGGTGCATTAATAATCAGGATTTACTCACACGCGGATGAAC  
CGTAACACTAGGGTTTGGCATGAAATGAAAAATAAAATCGGGGTTT  
GAGTCAATTGACCTGATTGAATTATTGTGCTTAATTGGTTGACCAGT  
TTCTGAGCCATGGGAGGTTCAAAATGCTGATC

**DFR AY227731.1**

GAGTCCGAATCCGTTTGTGTCACTGGCGCGTCCGGTTCCATCAGCT  
CCTGGCTCGTCATGAGACTCCTCGAGCGCGGTTACACCGTCTGCGC  
CACCGTGCCTGACCCAGTACGTCTATATATATCCTACATTTTGCTT  
TTTGACTTTTCGGCTTTCATAAGTATTTGGTTAGAGTTAATGTTTTG  
TGATTTATTAATGGACTGCAGCGAACCAGAAGAAGGTGAAGCATCT  
GTTGGACTTGCTGAAGGCGGAGACGCACATGACGCTGTGGAAGGC  
GGATCTGGCGGACGAGGGAAGCTTTGATGAAGCCATACAAGGCTG

CACCGGAGTGTTCCATGTTGCTACACCTATGGACTTTGAGCCCAAG  
GACCACGAGGTGTCATGCATGCATGCACAAAGAAAAAATGATACA  
TATACTATACTGCTGTACGTAGAAATACGAACAGGGAAATTA AAC  
TCGTATCAAAGATAAAGTACTGAGAAGTGGTAACTAAAACAAGA  
ATAAGATATTAGAAA ACTAAATTTTGTATGGTTTGACAGAATGAAG  
TGATCAAGCCAACAATCAATGGACTTTTGGACATCCTGAAGGCATG  
CCAGAAAGTTAAAACAGTTTGAAGGTTGGTGTTCACATCCTCAGCT  
GGAACCGTTATTATGGAAGAGCACAAAAGCCGGTCTACAACGAA  
TCCAACCGGAGCGATGTTGAATTTTGCCGCTTCGTCAGGATGACTG  
GTTGGGTAAGTAAACATAATCGATTTGTTATTGGTATTTCAAATA  
ATAGTCACCAATAATACATATTCTACATTTAACCTACTTTGTT CAGA  
TGTGCTTCGTCTCCAAGACTCTAGCTGAGCAAGCTGCATGGAAGTA  
TGCCAAAGAAAAACAACATTGATTT CATCACCATATCCCAACTCT  
TGTGATTGGTCCATTTCTCACGCCATCCATTCCACCAAGCCTTATCA  
CTGGACTTTCACCAATCACACGTAAAATTA AAAATATCACTCGAATA  
AAAGAAATAAGTGTTGTATAGTTCTATTGTTAGTTATTAACCTATGT  
AATTAACATCAAATTATTTAATTATTT CAGGAACTAAATCACATTAT  
GGCATCATCAGCAGGGGCAGTATGTTCACTTGGACGACCTCTGCCT  
TTCTCACATCTATTTGTACGAGCATT CGAAATCTGAGGGTCGCTAC  
ATTTGTTTCGTCACATGATGCAAAAATTCACGATCTTGTGAAAATGC  
TCAGAGAAAATACCCCGCGTACAATATTTCCACAAAGTAATTGCT  
AATTAATCCCTCCTAACCCCTTAAGATAAATTA ACTAATCAATTCTTT  
GTTACGCATATCATAATTGTTAACTAAACCCTAATGCAATGCAGGT  
TTTACGACA ACTTAGATACTATTCATTTTCTTCAAAGAAGTTGAGG  
CACGTAGGGTTTGAGTTCAAGTACAGCTTGGAGGACATGTTTGTGG  
G

**ANS DQ381771.1**

GAATCTCAACCATTCCAAAAGAGTACATCAGACCTAAAGATGAGCT  
CGCTAAACATTGGTGACATCTTCGAACAAGAGAAGAACAACGAAG  
GGCCTCAAGTTCCCACCATCGATTTGAAGGAGATAGAGTCCGATAA  
CGAAAAAGTGAGAGCAAAATGCAGGGAGGAGTTGAAGAAGGCAG  
CTGTGGACTGGGGTGTGCATGCACCTTGTGAACCATGGCATCTCCGA  
CGAGCTCATGGACAAGGTCAGGAAGGCCGGTAAGGCCTTCTTTGAC  
CTTCCCATTGAGCAGAAGGAGAAGTATGCCAATGACCAGGCCTCTG  
GTAAGATTCAAGGCTATGGAAGCAAGCTTGCAAACAATGCATCTG  
GGCAGCTTGAGTGGGAGGACTACTTCTTCCACTGTGTATACCCAGA  
GGACAAGCGTGACTTGTCTATTTGGCCTCAAACCTCCTGCTGATTAC  
ATGTAAGTACTTAAAAATCTTAGCATGCTTAATTGGTGTCACAATC  
GTAAACCCTAGTCTAAAATTTTAATTATATCCCCCAATTGGTTAAA  
ATTGTCAATAGTTCTATATATATTTGTAAAAGGCCCTCCTCCCCACA  
AGTAATTCTGGTTCCGCCACTTACTCTTGTTAACATCAATCTTTAAT  
ACCTTGGCAGTGAGGCAACCGCCGAGTATGCTAAGCAACTGAGGG  
AGCTAGCAACCAAGGTACTGAAAGTTTCTGTCACTTGGCTTGGGAT  
TGGATGAAGGGAGGCTGGGAGAAAGAAGTTGGTGGACTTGAAAGA  
GCTCCTCTTGCAAATGAAAATCAACTACTACCCAAAAATGCCCCTC  
CCCCGGAGCTTGGCCCTTGTGTGTTTGAAAGCTTCACCCTGAACG  
TGAGTGCACTCACCTTCATCCT

**UFGT AB074489.1**

GTAATTTCCGGCATGCTACTTCAAATGGGTCCGGCTCCTCCCCGCG  
CCACCGCAGTTTTTCATGAACTGTTTCGAAGAACTCGACCTCCCCGT  
AACAAACGACCTAAAGTCCAAATTCAACAAACTCCTCAACGTAGG  
ACCTTCCAACGTAGCGTCCCCGCTGCCACCGTCGGACGCTTGCTTG  
TCGTGGCTTGACAAGCAAGACGCTCCATCCTCCGTCGTGTACGTCA

GTTTCGGGTCCGTGGCGACCCCGCCGGAGAAGGATCTGCTAGCAAT  
AGCGGAGGCCCTGGAAGCCACGGGGGCTCCCTTCTTGTGGTCGCTC  
AAGGACAACCTCAAGACACCGTTGCTGAAAGAGTTCTTGACAAAA  
AGATTGGCAAAGTTGAACGGGATGGTGGTGCCGTGGGCTCCTCAGC  
CGCATGTCCTGGCCCACGCTTCGGTCGGAGCTTTCGTGTCACATTGC  
GGCTGGAACCTCGCTGCTGGAGACTATAGCCGGAGGGGTGCCCATG  
ATTTGTAG

**MYB DQ886416.1**

GCGTGCCACTGTTATCTCAATATAGCAGACGTAGAACAAGTATGTT  
TTGAGTGGTTACTTGCGCCTCAAGTTACTTAACTTTTTGTTTAAACA  
AAGGATTGTCGTAGATAGGCTAAGTCTGTGTTAAGTTCTTTTTCTTG  
CCTTGTGACCAATGACTTTTACTTGTGATTTTATATGTTTAGATGAA  
GGGAGTCCAAAGCCCTTTTGACCACTTGATTTGTTACAGTTAAACA  
CTTCAAGAGTTCAAATTTCTAACTTAGCCAGATTTGATCATAAAT  
GAGTATTAAGCAAAAAAACAGTTGAAAGTGAGTTAAAACACGAT  
AGAACATGCATTAAACAATAGATCTACAAAATGTATGTACAAACA  
CAAGGAAGTTGGGCAAGATTTCA

## Indice

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>INQUADRAMENTO VARIETALE.....</b>	<b>5</b>
Miglioramento genetico del pero .....	6
<b>MARCATORI MOLECOLARI E MAPPE GENETICHE .....</b>	<b>10</b>
<b>METABOLITI SECONDARI: LA TEORIA DELLA CO-EVOLUZIONE.....</b>	<b>15</b>
<b>I FENOLI.....</b>	<b>17</b>
<b>I FLAVONOIDI .....</b>	<b>20</b>
Biosintesi dei flavonoidi.....	22
Ruolo dei composti flavonoici nell'ecologia della pianta.....	29
Colorazione dei fiori e dei frutti .....	30
Protezione dai raggi UV-B .....	32
Interazione piante-animale .....	33
Proprietà mediche e dietetiche.....	34
Alterazione della via biosintetica dei flavonoidi.....	36
Misurazione del colore dei frutti: colorimetro .....	37
<b>MUTAZIONI .....</b>	<b>39</b>
<b>Trasposone.....</b>	<b>40</b>
Trasposoni procarioti .....	41
Meccanismi di trasposizione nei procarioti .....	42
Trasposoni eucarioti.....	43
Trasposoni delle piante .....	44
Trasposoni come mutageni .....	45
Retrotrasposoni .....	45

Trasposizione dei retrotrasposoni .....	46
Tipi di retrotrasposoni.....	47
Trasposoni LTR .....	47
Trasposoni non-LTR.....	47
<b>REAL TIME PCR .....</b>	<b>49</b>
<b>Descrizione della tecnica di Real time.....</b>	<b>50</b>
<b>Quantificazione dei livelli di mRNA usando la PCR Real Time (metodo Pfaffl 2001) .....</b>	<b>53</b>
<b>HPLC .....</b>	<b>55</b>
<b>GASCROMATOGRAFIA .....</b>	<b>59</b>
Rivelatori .....	61
<b>SPETROMETRIA DI MASSA .....</b>	<b>62</b>
Introduzione del campione.....	63
Ionizzazione ad impatto .....	64
Ionizzazione di campo .....	65
Ionizzazione chimica .....	65
Ionizzazione al plasma.....	65
Ionizzazione .....	66
Separazione degli ioni.....	66
Campo magnetico statico.....	67
Tempo di volo (o time-of-flight, TOF).....	68
Rivelatori .....	68
Cenni minimi all'interpretazione di uno spettro.....	70
Picco genitore .....	70
Effetti isotopici .....	71
Frammentazioni .....	72
<b>SCOPI DELLA TESI .....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIALE E METODI.....</b>	<b>76</b>
<b>Materiale Vegetale .....</b>	<b>77</b>
<b>Misurazione del colore.....</b>	<b>77</b>
<b>Estrazione e purificazione del DNA .....</b>	<b>79</b>
Marcatori funzionali per la via biosintetica del colore .....	81
<b>Clonaggio e sequenziamento dei geni putativi .....</b>	<b>83</b>

Preparazione di cellule competenti: .....	83
Preparazione del plasmide ricombinante: .....	84
Preparazione delle piastre: .....	84
Trasformazione: .....	85
Isolamento delle colonie trasformate: .....	86
Soluzioni: .....	88
<b>ANALISI DI ESPRESSIONE.....</b>	<b>90</b>
Accorgimento per lavorare con l'RNA.....	90
<b>Metodo di estrazione dell'RNA .....</b>	<b>91</b>
Soluzioni e reagenti .....	92
Trattamento con DNasi .....	93
Quantificazione dell'RNA e determinazione della purezza .....	94
Analisi di Real Time PCR quantitativa.....	94
Sintesi del primo filamento di cDNA .....	94
qRT-PCR .....	96
Analisi dei dati Real Time .....	98
<b>ANALISI FENOTIPICHE.....</b>	<b>100</b>
<b>HPLC .....</b>	<b>100</b>
<b>LC-MS.....</b>	<b>101</b>
Estrazione per LC-MS .....	101
<b>Cromatografia .....</b>	<b>102</b>
GC-MS .....	103
Estrazione per gc/ms .....	103
HS/SPME (Headspace solid phase microextraction).....	105
<b>RISULTATI .....</b>	<b>106</b>
Analisi del colore dei frutti.....	107
Clonaggio e caratterizzazione dei geni putativi .....	115
Analisi d'espressione genica con qRT-PCR .....	117
Analisi fenotipica con LC-MS.....	127
Analisi fenotipica con GC-MS .....	131
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>138</b>
Valutazione delle analisi del colore dei frutti .....	139

<b>Sequenziamento dei geni coinvolti nella sintesi dei pigmenti antocianici.....</b>	<b>142</b>
<b>Espressione dei geni.....</b>	<b>145</b>
<b>Analisi fenotipiche.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>152</b>
<b>Letteratura .....</b>	<b>154</b>
<b>Allegato A .....</b>	<b>161</b>
<b>INDICE .....</b>	<b>166</b>