

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

in

Colture erbacee, Genetica agraria e Sistemi Agroterritoriali

Ciclo XXI

AGR/07 GENETICA AGRARIA

**IDENTIFICAZIONE DI MUTANTI DI INTERESSE
AGRONOMICO IN ORZO MEDIANTE APPROCCI
DI GENETICA DIRETTA E INVERSA**

Presentata da: Dott. Riccardo Bovina

Coordinatore Dottorato

Prof Giovanni Dinelli

Relatore

Prof.ssa Maria Corinna Saguinetti

Esame finale anno 2009

INDICE DEGLI ARGOMENTI

<u>I INTRODUZIONE</u>	1
1. MUTAGENESI.....	2
1.1 Materiale vegetale per il trattamento mutageno.....	5
1.2 Fattori che influenzano la mutagenesi.....	6
1.3 La mutagenesi fisica.....	7
1.4 Mutagenesi chimica.....	8
1.4.1 L'azide sodica.....	9
1.5 Ruolo della mutagenesi nel miglioramento genetico.....	13
2. LA GENETICA INVERSA.....	16
2.1 Strategie di genetica inversa.....	18
2.2 Mutagenesi mirata in genetica inversa.....	18
2.2.1 Gene targeting.....	19
2.2.2 Silenziamento genico.....	19
2.2.3 Nucleasi "zinc-finger".....	20
2.3 Mutagenesi casuale in genetica inversa.....	21
2.3.1 Mutagenesi inserzionale.....	21
2.3.2 Mutagenesi fisica: Deletagene.....	24
2.4 Mutagenesi chimica in genetica inversa: il TILLING.....	25
2.4.1 Produzione di una popolazione mutagenizzata.....	28
2.4.1.1 Scelta della specie.....	28
2.4.1.2 Scelta del mutageno chimico.....	29
2.4.1.3 Trattamento mutageno.....	31
2.4.2 Scelta del gene bersaglio.....	33
2.4.3 Analisi molecolare TILLING.....	34
2.4.3.1 Pooling e formazione dell'eteroduplex.....	34
2.4.3.2 Digestione enzimatica.....	36

2.4.3.3	Visualizzazione dei frammenti.....	37
2.4.3.4	Sequenziamento e analisi delle mutazioni.....	39
2.5	Dall'analisi molecolare al fenotipo.....	40
2.6	Ecotilling.....	42
2.7	Esempi di applicazione della strategia TILLING.....	44
2.7.1	Risorse TILLING in orzo.....	46
2.8	Utilizzo del TILLING per il miglioramento genetico.....	47
3.	L'ORZO.....	49
3.1	Domesticazione della specie.....	49
3.2	Botanica e tassonomia.....	50
3.3	Miglioramento genetico.....	50
3.4	Impiego ed importanza economica.....	52
3.5	Caratteristiche morfologiche.....	53
3.6	Importanza ed analisi dell'apparato radicale in orzo.....	58
3.6.1	Mutanti della radice e loro utilizzo.....	58
3.6.2	Identificazione di Quantitative Trait Locus (QTL) e utilizzo in programmi di selezione assistita.....	61
3.7	Esigenze ambientali e sostenibilità.....	61
 <u>II OBIETTIVI</u>		64
 <u>III MATERIALI E METODI</u>		67
1.	La risorsa TILLMore.....	68
2.	Allevamento ed analisi fenotipica delle famiglie M₃.....	69
3.	Campionamento ed estrazione del DNA	70
4.	Preparazione del DNA tramite diluizione e pooling	71
5.	Aspetti molecolari della procedura TILLING.....	71
5.1	Selezione dei geni e progettazione dei primer.....	71
5.2	Amplificazione mediante PCR.....	75

5.3 Digestione e purificazione.....	76
5.4 Separazione elettroforetica.....	77
5.5 Sequenziamento.....	78
6. Analisi delle famiglie segreganti M₄ con marcatori CAPS.....	79
7. Analisi bioinformatica delle proteine mutanti.....	82
8. Ricerca ed osservazione dei mutanti radicali	83
9. Analisi dei mutanti allo stereo microscopio.....	84
<u>IV RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	86
1. Frequenza e descrizione dei mutanti M ₃	87
2. Frequenza e descrizione dei mutanti radicali.....	97
3. Identificazione di mutanti per geni coinvolti nello sviluppo e architettura radicale	100
4. Analisi delle mutazioni identificate	106
4.1 Analisi della direzione delle mutazioni.....	106
4.2 Analisi della densità di mutazione.....	107
5. Analisi CAPS delle famiglie mutanti	110
6. Predizione dell'effetto delle mutazioni del gene <i>HvEXPβ1</i> mediante analisi bioinformatica.....	111
7. Analisi fenotipica dei mutanti radicali.....	114
<u>V CONCLUSIONI</u>	116
<u>VI BIBLIOGRAFIA</u>	121
<u>TABELLE</u>	145
<u>FIGURE</u>	156

I INTRODUZIONE

1. LA MUTAGENESI

La mutagenesi può essere definita come l'insieme di tecniche che consentono di indurre mutazioni in un determinato organismo riproducendo così in modo artificiale ciò che avviene da sempre in natura; le mutazioni spontanee sono infatti un processo biologico fondamentale per la creazione della variabilità genetica presente nelle popolazioni naturali e, insieme alla ricombinazione genica, sono alla base dei fenomeni evolutivi.

Le mutazioni consistono in una alterazione del materiale genetico ereditario a diversi livelli:

- mutazioni genomiche: comportano alterazioni del numero cromosomico e sono distinte in aneuploidia o euploidia;
- mutazioni cromosomiche: comportano alterazioni della struttura dei cromosomi e sono distinte in delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni;
- mutazioni geniche: interessano una o poche paia di basi in un singolo locus genico (si parla perciò di mutazioni puntiformi) e sono distinte in inserzioni o delezioni di basi e sostituzioni; in quest'ultimo caso si distinguono transizioni (sostituzione di purina con purina o pirimidina con pirimidina) e trasversioni (purina sostituita da pirimidina e viceversa).

Per quanto riguarda gli effetti dei vari tipi di mutazioni, quelle genomiche e cromosomiche possono essere deleterie e, nella maggior parte dei casi, comportano alterazioni molto più evidenti rispetto a quelle geniche; pertanto sono queste ultime le più utili ai fini di studi di genetica o per applicazioni nel miglioramento genetico.

La sostituzione di una base, quando interessa regioni geniche codificanti (esoni), comporta il cambiamento di una tripletta che codifica per un aminoacido della proteina con diversi effetti sulla funzionalità della proteina stessa; si distinguono infatti mutazioni silenziose, in cui, per la degenerazione del codice genetico, il codone alterato codifica per lo stesso aminoacido; mutazioni neutre se si ha cambiamento di un

aminoacido tale però da non alterare la funzione proteica; mutazioni di-senso (missense mutation) in cui il codone modificato specifica un aminoacido diverso che altera in modo più o meno evidente, senza tuttavia sopprimerla, la funzionalità della proteina a seconda del sito mutato, e si possono originare quindi diverse varianti fenotipiche; mutazioni non-senso (nonsense mutation) quando si forma un codone di-stop che causa la terminazione prematura della sintesi proteica con perdita della sequenza a valle del sito mutato e produzione di una proteina troncata in genere non funzionale. Inoltre mutazioni a livello dei siti di splicing nelle giunzioni tra introni ed esoni possono causare la perdita di tali siti o la produzione di nuovi, con conseguente produzione di proteine troncate.

Le inserzioni o delezioni di una singola coppia di basi sono dette anche mutazioni “frameshift” perché comportano uno slittamento del modulo di lettura delle triplette causando un’alterazione della sequenza aminoacidica a valle del sito mutato con perdita, in genere, della funzionalità della proteina codificata.

Talvolta si possono verificare anche retromutazioni che comportano la reversione della mutazione originale (detta anche “forward mutation”) che inattiva il gene selvatico, ripristinando la funzione della proteina; le retromutazioni richiedono però condizioni più specifiche e si verificano quindi con frequenze inferiori di circa 10 volte rispetto alle “forward mutation”.

In generale quindi le mutazioni possono provocare diversi effetti (letali, favorevoli o sfavorevoli) e, negli ultimi due casi, possono pertanto essere trasmesse alla progenie fissandosi nel corso delle successive generazioni oppure essere eliminate per effetto della selezione naturale.

Nell’ambito delle specie vegetali coltivate è importante considerare che anche l’azione selettiva operata dall’uomo in migliaia di anni di domesticazione ha avuto un ruolo fondamentale, favorendo il mantenimento degli alleli per caratteristiche agronomiche superiori tra tutti quelli generatisi in seguito a mutazioni spontanee nella popolazione.

Le mutazioni si verificano in natura con frequenze molto basse, caratteristiche per ogni organismo, e in genere sono sfavorevoli, perché comportano una perdita di

funzione, e quindi recessive (mentre quelle con acquisto di funzione sono per lo più dominanti); restano così mascherate a livello fenotipico dall'allele dominante quando presenti in eterozigosi, o possono essere eliminate dalla selezione se presenti in omozigosi.

Alla luce di tutte queste considerazioni, si sono sviluppati gli studi di mutagenesi sperimentale, che sfruttano l'azione di agenti mutageni fisici o chimici per ottenere mutazioni indotte con una frequenza più alta rispetto a quelle spontanee. Lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare ha reso disponibile anche un'altra classe di mutageni, quelli "biologici", come i trasposoni o il T-DNA di *Agrobacterium tumefaciens*, che permettono l'inserzione di DNA esogeno nei geni modificandone la sequenza (Alonso *et al.*, 2003); si parla in questo caso di mutagenesi inserzionale, che sarà approfondita nel capitolo sulla genetica inversa.

Tra i primi lavori di mutagenesi si possono citare quelli di Muller su *Drosophila melanogaster* (Muller, 1927) e di Stadler su cereali quali orzo e mais (Stadler, 1928a; Stadler, 1928b), che fornirono una dimostrazione della capacità di un agente fisico come i raggi X di incrementare la frequenza di mutazione in modo significativo.

In seguito a queste scoperte e sino agli anni '40 si assiste così allo sviluppo della radiogenetica, cioè studi di genetica in cui si sfrutta l'azione mutagena di radiazioni penetranti quali quelle ionizzanti (raggi X, raggi gamma); i materiali d'elezione erano appunto *Drosophila melanogaster* e cereali (Ward, 1934; Eriksson, 1963), e proprio in orzo si ottennero i primi risultati applicativi grazie all'opera dello svedese Gustafsson (1963).

Al periodo della seconda guerra mondiale risale invece la scoperta da parte di Auerbach di un primo potente mutagene chimico, l'iprite, e si avviano studi più approfonditi grazie anche allo sviluppo della genetica dei microrganismi, sfruttando i ridotti tempi di moltiplicazione e la possibilità di lavorare con un numero molto elevato di individui in spazi ridotti, rispetto agli organismi superiori.

Notevoli progressi nell'ambito della mutagenesi si sono poi ottenuti utilizzando specie vegetali come *Arabidopsis thaliana*, una piccola crucifera, con ciclo vitale

breve, e *Tradescantia*, una specie erbacea perenne, entrambe provviste di pochi cromosomi e quindi utili per studi di citogenetica.

Sempre maggiore importanza ha poi acquisito il trattamento su seme, che per le sue peculiari caratteristiche si è rivelato particolarmente idoneo a questo tipo di esperimenti, e molte specie di cereali (soprattutto autogame come frumento, orzo, riso, ma anche allogame come il mais) hanno assunto un ruolo di primo piano negli studi di mutagenesi artificiale applicati alla genetica (Bianchi e Marocco, 1989).

1.1 MATERIALE VEGETALE PER IL TRATTAMENTO MUTAGENO

Nelle piante a riproduzione gamica i trattamenti mutageni si effettuano principalmente su seme o su polline.

L'utilizzo del polline offre alcuni vantaggi quali la possibilità di lavorare con grandi quantità di materiale in spazi ridotti e di utilizzare anche le radiazioni ultraviolette (U.V.); inoltre, fecondando una pianta portaseme demasculata coi granuli pollinici mutagenizzati, si possono ottenere piante interamente eterozigoti per la mutazione. Un limite è che il trattamento va effettuato in loco, o non a grandi distanza, in quanto il trasporto e la conservazione del polline risulta in genere abbastanza complesso. Il seme al contrario può essere facilmente inviato a centri appositi per la mutagenesi e conservato per un certo periodo prima di essere impiegato, inoltre è una struttura più resistente del polline e subisce quindi meno danni fisiologici in seguito a certi trattamenti. Tuttavia vi sono anche alcuni problemi: mutazioni che interessano l'endosperma non sono utili in quanto non conservate nelle generazioni successive; inoltre, essendo l'embrione una struttura pluricellulare, le mutazioni possono interessare solo alcune cellule, e in cellule diverse si possono verificare mutazioni diverse. Dal seme M_1 (ottenuto in seguito a trattamento del cosiddetto seme M_0) si originano pertanto piante M_1 con una certa frequenza di chimerismo e portanti le mutazioni allo stato eterozigote. Queste mutazioni possono poi segregare ed essere fissate in omozigosi nella generazione M_2 , ottenuta per autofecondazione delle piante M_1 , ma solo se il trattamento del seme ha indotto mutazioni nelle cellule progenitrici

della linea germinale. Le mutazioni a livello delle cellule somatiche, invece, non sono trasmissibili alla progenie e quindi sono perse nelle generazioni successive alla M_1 . Dal numero delle cellule progenitrici, definito da Li e Redei “genetically effective cell number” (GECN), dipendono i rapporti di segregazione che indicano il numero di mutanti omozigoti attesi in M_2 (Koornneef, 2002). Indicazioni quali il GECN e la strategia riproduttiva (autogamia o allogamia) della specie da sottoporre a mutagenesi, influiscono sul numero di piante M_1 da allevare e su quello di M_2 da saggiare per ottenere un certo numero di mutanti. In genere per i cereali è consigliabile raccogliere separatamente tutte le spighe delle piante M_1 e allevare le M_2 in fila per spiga oppure raccogliere e seminare un seme per ogni spiga M_1 , un metodo quest’ultimo per aumentare l’efficienza di analisi contenendo l’ampiezza della popolazione M_2 ; è importante inoltre proseguire la selezione dei mutanti anche nelle famiglie M_3 .

Nel caso di specie a propagazione vegetativa si trattano parti di pianta (marze o talee), provviste di gemme contenenti gli apici meristematici, in grado di dividersi attivamente originando i vari organi della pianta. Le gemme sono strutture multicellulari e, come nel caso del trattamento ai semi, si ha quindi la formazione di chimere di vario tipo; per ottenere un mutante non chimerico si possono prelevare cellule solo dal settore gemmario mutato e, ove possibile, rigenerare la pianta tramite coltura.

1.2 FATTORI CHE INFLUENZANO LA MUTAGENESI

Sulla base di vari studi, come quelli di Cadelcott e Konzak negli anni '60 su semi di orzo, si sono evidenziati i vari fattori da cui dipende il risultato del trattamento mutageno. Tra questi fondamentale è sicuramente la specie vegetale su cui si opera, considerandone la sensibilità a diversi agenti, la modalità riproduttiva, il livello di ploidia; molto importante è anche lo stato metabolico e la fase del ciclo cellulare in cui si trova il materiale da sottoporre a mutagenesi, nonché le caratteristiche del trattamento applicato, come tipo e dose di agente mutageno (in generale è preferibile

non usare la dose massima al fine di limitare le mutazioni indesiderate o letali e la sterilità delle piante M_1). Anche altri parametri come presenza di ossigeno, temperatura, pressione e pH possono essere variati per aumentare l'efficienza a seconda dell'agente impiegato (Koornneef, 2002); inoltre per i semi, e in misura minore per il polline, bisogna tener presente che prolungando l'intervallo di tempo tra il trattamento e la germinazione si può avere un aumento dell'effetto mutageno detto "effetto storage" (Bianchi e Marocco, 1989).

1.3 MUTAGENESI FISICA

Per realizzare questo tipo di mutagenesi si utilizzano agenti fisici riconducibili a due tipologie principali:

- radiazioni ionizzanti che, nell'attraversare la materia vivente, causano la formazione di ioni e radicali liberi a livello di composti cellulari in seguito a collisioni casuali tra atomi con cessione di energia. Questi processi di ionizzazione sono probabilmente la causa principale degli effetti biologici delle radiazioni che, oltre a un danno diretto al DNA, determinano anche danni indiretti a vari componenti cellulari. Si osservano in genere rotture di vari legami nei filamenti del DNA e formazione di nuovi legami anomali, eventi che possono determinare mutazioni geniche ma anche molte aberrazioni cromosomiche, con conseguente sterilità di vario grado. Tra gli agenti di questo tipo troviamo i raggi X, molto usati e meno pericolosi rispetto ai raggi gamma (emessi ad esempio dal cobalto radioattivo) o ai neutroni veloci ottenuti in reattori nucleari. Essendo le radiazioni ionizzanti dotate di alto potere penetrante possono essere usate per trattare semi o parti vegetative della pianta, oltre che polline.

- radiazioni non ionizzanti, come i raggi U.V. che provocano eccitazione degli elettroni delle basi puriniche e pirimidiniche da cui sono assorbiti, ma non ionizzazioni. Ciò determina varie alterazioni del DNA come la formazione di dimeri di timina, con problemi nella replicazione, e conseguenti mutazioni geniche di vario tipo (sostituzioni, delezioni o inserzioni). I raggi U.V. hanno scarso potere penetrante e il loro uso è quindi limitato alla mutagenesi di polline o cellule vegetali ed animali coltivate in vitro.

1.4 MUTAGENESI CHIMICA

Questo tipo di mutagenesi sfrutta l'azione di vari composti chimici molto efficaci nell'indurre mutazioni benché alcuni provochino contemporaneamente un'elevata letalità, riducendo l'efficienza del trattamento. Proprio per questo è fondamentale valutare bene, tramite saggi appositi, la dose ottimale di mutagene da impiegare per ottenere il maggior numero di mutazioni utili tenendo però basso il numero di quelle letali o dei mutanti sterili.

Rispetto a quella fisica, la mutagenesi chimica presenta alcuni vantaggi: l'ampio spettro di molecole mutagene permette di effettuare studi più approfonditi; è possibile ottenere mutazioni più specifiche (ad esempio transizioni o transversioni), scegliendo un certo composto chimico, rispetto a quelle prodotte dalle radiazioni. Inoltre gli agenti chimici risultano più utili ai fini del miglioramento genetico in quanto inducono principalmente mutazioni geniche a differenza dei mutageni fisici che causano anche aberrazioni cromosomiche spesso deleterie.

In generale si distinguono tre classi principali di mutageni chimici in base al loro meccanismo d'azione:

- Analoghi di basi: composti aventi struttura simile a quella delle basi puriniche o pirimidiniche e che possono essere pertanto incorporati nel DNA durante la replicazione causando errori d'appaiamento che danno origine a sostituzioni di basi. Tra questi composti troviamo il 5-bromouracile e la 2-aminopurina.
- Agenti intercalanti: composti che si legano alla doppia elica del DNA distorcendola e provocando durante la replicazione l'aggiunta o la perdita di una o poche coppie di basi, cioè inserzioni o delezioni, che comportano uno slittamento del modulo di lettura delle triplette ("frameshift mutation"). Gli intercalanti, come le acridine o il bromuro d'etidio, causano pertanto effetti più rilevanti rispetto agli altri mutageni chimici che inducono invece sostituzioni di basi.

- Agenti alchilanti: composti che reagiscono con gli acidi nucleici causando modificazioni tramite alchilazione dei nucleotidi, con conseguenti sostituzioni o, più raramente, delezioni di basi. L'evento indotto più di frequente è la formazione di 7-alchilguanina che si appaia non con la citosina ma con la timina e, in seguito a replicazione del DNA, si ha una transizione (la coppia G-C è sostituita da quella A-T); si può verificare anche la depurinazione della guanina che causa invece delezioni. In generale agiscono come alchilanti i composti nitrosi, i solfati e sulfonati, gli epossidi, le etilenimine, la formaldeide e l'iprite. Più in particolare si possono citare nell'ambito di questa classe alcune delle sostanze più usate per la mutagenesi delle piante coltivate: l'etilmetansulfonato (EMS), molto usato in *Arabidopsis thaliana*, il dietilsolfato (dES), l'etilenimina (EI), la nitrosoguanidina (NG), l'etilnitrosourea (ENU) e la metilnitrosourea (MNU).

I composti di questa classe sono molto efficienti come mutageni, in quanto prontamente disponibili e molto penetranti in soluzione acquosa o sospesi in olio, ma presentano, come tutti i mutageni chimici, rischi per la salute umana essendo potenti cancerogeni e volatili; richiedono pertanto l'uso di opportune precauzioni da parte degli operatori.

Un discorso a parte riguarda gli agenti in grado di causare raddoppiamento del numero cromosomico cellulare, tra cui il più importante è la colchicina, che agisce bloccando la formazione del fuso mitotico e impedendo quindi la disgiunzione dei cromatidi.

1.4.1 L'AZIDE SODICA

L'azide sodica (NaN_3) è un composto di largo impiego, già da tempo utilizzato nei laboratori chimici per l'ampio spettro di reazioni a cui può dar luogo, oltre a numerose applicazioni in varie industrie (ad esempio come generatore d'azoto per gli airbag) o in agricoltura per le sue proprietà erbicide, nematocide e fungicide (limitate però dalla alta

volatilità e bassa persistenza nel suolo). In ambito scientifico la sua importanza risiede soprattutto nell'essere un potente mutageno chimico, pur non essendo un agente alchilante, che si è rivelato tra i più efficaci in orzo e, in diversa misura anche in altre specie vegetali quali *Triticum monococcum*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Vicia faba* (ma non *Arabidopsis thaliana*), oltre che in lievito, in *Salmonella typhimurium* e in *Escherichia Coli* (Kleinhofs *et al.*, 1978).

Le azidi inorganiche, di cui fa parte la NaN_3 sono caratterizzate da legami ionici mentre le azidi organiche hanno legami covalenti. Studi sulle azidi inorganiche si sono sviluppate a partire dalla scoperta dell'acido idrazoico nel 1890, evidenziando le proprietà tossiche di tali composti, prima fra tutte la capacità d'inibire la respirazione (Kleinhofs *et al.*, 1978). Il notevole potenziale mutageno dell'azide è stato poi scoperto indirettamente grazie a studi di Spence (1965) sui meccanismi di riparazione delle rotture cromosomiche indotte in semi di orzo irradiati, una parte dei quali trattati con azide e originanti una popolazione di piante usate come controllo negativo (in quanto l'effetto inibitorio sulla respirazione sembra rallentare il processo di riparazione). Tra queste ultime si osservò però un numero significativo di mutanti clorofilla-deficienti (circa il 6%) indotti dall'azide stessa e non dalle radiazioni (Afsar Awan *et al.*, 1980); questa frequenza di mutazione aumenta fino al 20% usando soluzioni a pH inferiore al pKa dell'azide (quindi $\text{pH} < 4,8$; pH ottimale = 3): in tal modo la specie predominante è la molecola non carica dell'acido idrazoico (HN_3) che penetra più facilmente attraverso le membrane cellulari rispetto allo ione N_3^- (Kleinhofs *et al.*, 1978).

Un ulteriore notevole aumento della frequenza di mutazione si può ottenere sottoponendo i semi ad imbibizione alla temperatura di 0 °C e pre-germinazione a 20 °C in acqua addizionata di ossigeno per alcune ore (a seconda della specie). Questo pretrattamento è efficace anche per altri mutageni chimici che, nel caso di mutagenesi su seme, per poter reagire col DNA delle cellule meristematiche, devono diffondere nell'embrione attraverso la membrana di rivestimento (testa) del seme. Questo tessuto di rivestimento presenta diversa permeabilità ai diversi composti a seconda della specie vegetale considerata e ciò spiega in parte le differenti risposte ai trattamenti. In

generale, comunque, l'imbibizione, idratando i tessuti, serve proprio a facilitare la penetrazione dei composti chimici e a proteggere i sistemi cellulari da danni fisiologici (Konzak, 1987). Questo pretrattamento ha anche un effetto di stimolazione dei processi metabolici e della sintesi di ATP, influenzando così sull'attività mitotica e le altre fasi del ciclo cellulare, e ciò è importante poiché l'azione mutagena dell'azide dipende dallo stato del DNA nelle cellule embrionali. Vari esperimenti hanno infatti evidenziato come la frequenza di mutanti clorofilliani sia incrementata quando la fase di pre-germinazione a 20°C è protratta per 8-16 ore e, poiché dopo tale periodo di tempo le cellule dell'apice del germoglio sono nella fase S del ciclo cellulare, si è ipotizzato che l'azide sia un mutageno attivo proprio in questa fase in cui avviene la replicazione del materiale genetico (Sander e Nilan, 1974). Tuttavia, tempi di pre-germinazione troppo prolungati causano un incremento della letalità del trattamento rendendo necessario un ulteriore aumento del numero di semi da trattare.

Alcuni studi hanno evidenziato che l'acido gibberellico, aggiunto dopo il trattamento, incrementa in modo indiretto l'effetto dell'azide, in quanto attiva enzimi promuoventi una maggiore crescita della pianta e quindi la sua sopravvivenza, anche in presenza di mutazioni. Altre sostanze, tra cui il cianuro di potassio, hanno invece un'influenza negativa sull'efficacia dell'azide, riducendone l'attività sui semi trattati (Prina e Favret, 1983).

A livello fenotipico, in seguito a trattamenti con azide sodica, si sono ottenute alcune categorie di mutanti utili di tipo morfologico come i semi-dwarf, fisiologico quali linee a spigatura precoce, e biochimico tra cui mutanti che accumulano prolina (Bright *et al.*, 1981) e quelli privi di proantocianidina o antocianina (Olsen *et al.*, 1993). Per quanto riguarda gli effetti dell'azide sodica, i molti esperimenti condotti in orzo hanno evidenziato come questa molecola induca in popolazioni M₂ un'elevata frequenza (superiore al 50%) di mutazioni clorofilliane (Nilan *et al.*, 1973) e un alto livello di sterilità delle piante M₁ (Prina *et al.*, 1983). Si è osservata inoltre sterilità parziale nelle generazioni M₂ e fino a generazioni anche avanzate di selezione; questo aspetto limita l'uso di questi mutanti nel miglioramento genetico, riducendo l'efficienza d'uso della

NaN₃. Si sono condotti perciò degli studi per caratterizzare le linee mutanti aventi sterilità parziale in modo da comprenderne i meccanismi e manipolarle per tentare di ridurre il fenomeno.

Questi lavori (Crispi *et al.*, 1987) hanno portato alla conclusione che la sterilità parziale non dipende da alterazioni della struttura o del numero di cromosomi e neppure dalla presenza di geni letali per l'embrione o per l'endosperma, bensì da interazioni tra l'ambiente e mutazioni geniche minori e recessive, letali quando presenti in omozigosi, e che devono essere quindi allo stato eterozigote nelle linee mutanti inizialmente selezionate; tale sterilità è infatti eliminabile incrociando il mutante col parentale non trattato.

L'azide può indurre anche anomalie meiotiche pur non causando aberrazioni cromosomiche; uno dei pochi casi descritti è infatti una traslocazione reciproca che coinvolge i cromosomi 6 e 7 di orzo (Lehman *et al.*, 1977). Queste anomalie alla meiosi sono probabilmente correlate all'alta sterilità delle piante M₁ e possono renderne conto, almeno in parte, anche in assenza di mutazioni cromosomiche visibili (Prina *et al.*, 1983).

L'azione dell'azide sodica si esplica a livello del DNA tramite l'induzione di sostituzioni di basi, che causano spesso mutazioni di-senso; nel caso del gene *Ant18* (coinvolto nella sintesi di antocianina) di orzo si sono osservate transizioni in direzione G/C – A/T, tre volte più frequenti rispetto a quelle A/T – G/C, e, in numero inferiore, anche transversioni del tipo A/T – T/A (Olsen *et al.*, 1993).

La peculiarità dell'azide consiste nell'essere un raro esempio di promutageno; esso viene, infatti, metabolizzato e convertito, in alcune piante (*Hordeum vulgare*) o batteri (*Salmonella*), in un composto stabile e dotato di attività mutagenica vera e propria, l'azidoalanina (Owais *et al.*, 1983) tramite condensazione della NaN₃ con O-acetilserina catalizzata dall'enzima O-acetilserina sulfidrilasi. L'azidoalanina potrebbe interagire direttamente col DNA oppure essere convertita in un altro composto (ad esempio l'azidopiruvato); ma in entrambi i casi l'interazione col DNA avviene a livello

del gruppo azide (Olsen *et al.*, 1993). Da studi in vitro sull'effetto dell'azidoalanina in embrioni di orzo, il meccanismo d'azione sembra essere l'induzione di siti sensibili alle endonucleasi e alla proteinasi K, con rotture a singolo filamento, e l'interazione con proteine ed enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA (Veleminsky *et al.*, 1987a; Veleminsky *et al.*, 1987b).

1.5 RUOLO DELLA MUTAGENESI NEL MIGLIORAMENTO GENETICO

La mutagenesi sperimentale è stata largamente utilizzata in passato per studi di genetica classica, soprattutto sulla natura del gene e sulla trasmissibilità dei caratteri, oltre a quelli sulle relazioni sistematiche tra le specie entro un certo genere e sulla struttura genetica delle popolazioni (importanti a questo proposito gli studi sul genere *Triticum* di McKey e Konzak negli anni '60).

Più di recente inoltre si sono abbinate le potenzialità della mutagenesi con un approccio di tipo molecolare per approfondire le indagini di genomica funzionale. La mutagenesi infatti, inducendo l'inattivazione di diversi loci genici, permette di creare ampie popolazioni di mutanti da usare per analisi di genetica diretta o inversa. Se da un lato il ricorso a mutanti cosiddetti "biologici", quali i trasposoni o il T-DNA, è stato molto utile per il progresso della genomica funzionale in specie vegetali modello, nel caso dei cereali la mancanza di sistemi di trasformazione semplici e l'ampiezza notevole del genoma ha limitato l'utilità di questi sistemi, rendendo preferibile l'uso dei mutageni tradizionali chimici o fisici (Caldwell *et al.*, 2004).

Tuttavia una delle sue applicazioni più importanti ha riguardato, soprattutto nei decenni passati, il miglioramento genetico tradizionale delle piante. Quest'ultimo si basa sulla selezione di nuove cultivar con caratteristiche superiori e ha pertanto come presupposto la presenza di variabilità genetica entro la popolazione. Una volta esaurita la variabilità presente nel germoplasma naturale si può ricorrere alla mutagenesi per creare nuova variabilità ed effettuare quindi il processo di selezione dei genotipi desiderati.

Una prima strategia usata già negli anni '50-'60, detta “direct mutation breeding”, consisteva nell’induzione e selezione di un mutante che può costituire una nuova cultivar, in cui si è realizzato il miglioramento di un carattere monogenico (a eredità mendeliana semplice) mantenendo inalterati gli altri caratteri (MacKey, 1965).

In questo modo è stato possibile ridurre il tempo di sviluppo di varietà migliorate aumentando quindi i benefici ottenibili da esse (Micke e Donini, 1982) se si considera che uno dei fattori limitanti il miglioramento genetico consiste proprio nei lunghi tempi necessari per le fasi ripetute di incrocio e selezione prima di arrivare al rilascio di nuove cultivar.

A questo proposito si possono citare gli studi di Yamagata (1981) i quali hanno evidenziato che, nei cereali diploidi come l’orzo, il periodo di tempo per realizzare una cultivar mutante con questo metodo varia da 4 a 7 anni, circa la metà di quello normalmente richiesto col breeding senza mutagenesi.

Successivamente si è sviluppata un’altra strategia, detta “mutation cross-breeding”, che consiste nell’incrocio tra un genotipo mutante e uno coltivato (seguito da varie generazioni di reincrocio) per introdurre il carattere utile in quest’ ultimo, oppure nell’incrocio tra due mutanti combinando così i caratteri voluti nello stesso background genetico. Questo metodo permette lo sviluppo indiretto di nuove varietà; ma in questo caso, però, non si ha il vantaggio della riduzione dei tempi perché bisogna considerare anche le fasi di incrocio delle linee mutanti e di selezione dei ricombinanti utili (Yamagata, 1981).

In generale, l’approccio del “mutation breeding” può essere perciò visto come un metodo per l’ottenimento di cultivar migliorate complementare agli altri a disposizione dei breeder, come l’incrocio intraspecifico e interspecifico o tecniche basate sulle colture in vitro (induzione di variazione somaclonale, fusione di protoplasti, ottenimento di aploidi raddoppiati), senza considerare l’ingegneria genetica.

La scelta di un metodo dipende dalla specie vegetale considerata, dalla tecnologia di cui si dispone e da vari altri fattori; la mutagenesi resta, probabilmente, tra gli approcci tradizionali uno di quelli con maggior potenzialità nella creazione di nuova variabilità a

livello genetico, e che permette quindi di produrre le maggiori modificazioni a livello fisiologico e morfologico.

Tanti sono infatti i risultati ottenuti ad oggi con questa tecnica; tra i più importanti per fini applicativi si citano: resistenza a patogeni e parassiti o a stress abiotici, modificazioni morfologiche degli organi vegetativi e riproduttivi, maschiosterilità, variazione dell'epoca di fioritura, miglioramento qualitativo. Per citare qualche esempio si possono ricordare i frumenti a taglia ridotta e aumentata produttività, resistenti alla ruggine dei cereali, o varianti ad alto contenuto proteico nella cariosside (Corpuz *et al.*, 1983); per l'orzo, i mutanti ad alto contenuto proteico, ad esempio con livelli più elevati dell'amminoacido lisina (Eggum, 1978) o quelli privi di antocianine e proantocianidine nel tegumento del seme, usati nel breeding di cultivar da malto per evitare la stabilizzazione chimica della birra contro l'opacità da polifenoli (Olsen *et al.*, 1993).

In conclusione è importante sottolineare come il successo di un programma di miglioramento genetico basato sul "mutation breeding" dipenda, in buona parte, da un'accurata scelta del materiale iniziale e dalla pianificazione della strategia più idonea in base agli obiettivi prefissati, valutando anche le possibili interazioni tra geni, come gli effetti epistatici, o l'associazione tra una mutazione utile e una dannosa. Inoltre bisogna tener presente la necessità di pianificare un trattamento su ampia scala e di saggiare molte piante della generazione M_2 per aumentare la probabilità di ottenere almeno un mutante utile per il carattere d'interesse; ciò è necessario in quanto: non è possibile usare dosi troppo alte di mutageno, la mutagenesi chimica o fisica non è sito-specifica e vi è elevato chimerismo delle piante M_1 .

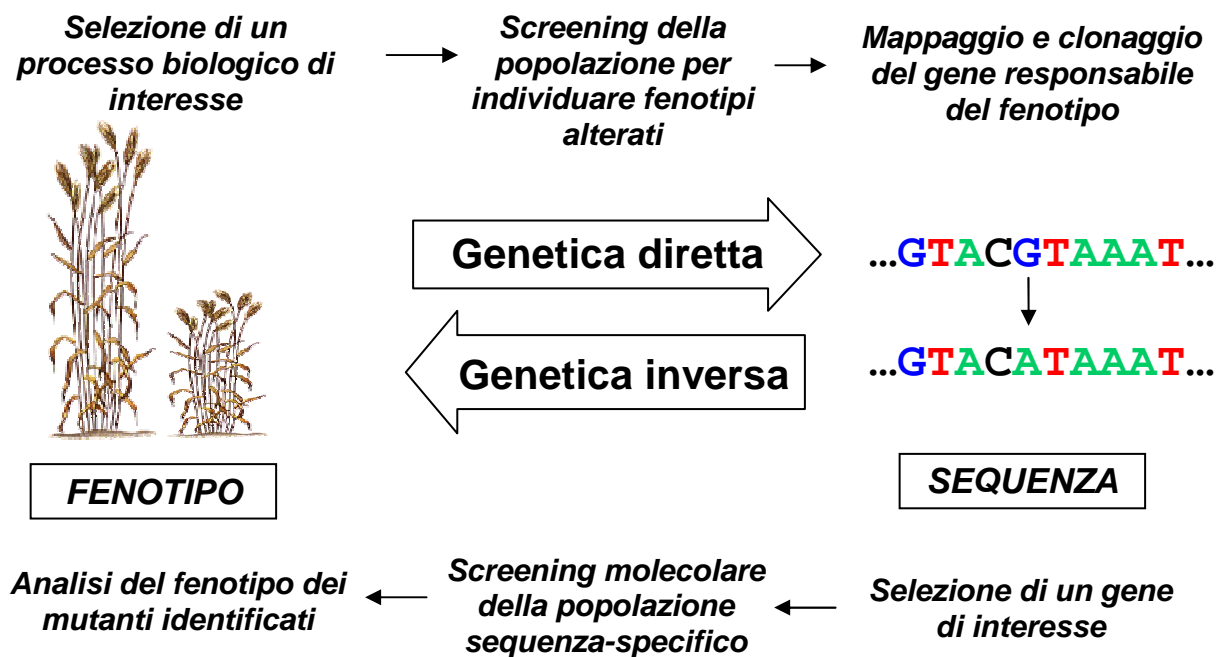
Infine, dalle precedenti considerazioni si evince come queste strategie siano applicabili solo al miglioramento di caratteri qualitativi (a controllo monogenico) o a caratteri quantitativi (a controllo poligenico) in cui sia noto un "major gene", perché risulterebbe molto difficile ottenere contemporaneamente mutazioni utili in tutti i loci che controllano un carattere quantitativo.

2. LA GENETICA INVERSA

Con il termine “genomica funzionale” vengono indicate una serie di differenti metodologie che hanno lo scopo di desumere la funzione dei geni su scala genomica. L'utilizzo di queste tecniche è stato notevolmente facilitato dallo sviluppo di nuove tecnologie sempre più raffinate, efficaci ed applicabili a quasi tutti gli organismi. L'utilizzo di strumenti bioinformatici per l'allineamento di sequenze omologhe tra organismi differenti e lo studio dei pattern di espressione genica su larga scala sono solo due tra gli innumerevoli esempi di strategie di genomica funzionale utilizzati attualmente. Nonostante queste tecnologie siano estremamente importanti per dedurre informazioni generali su una nuova sequenza genica (la somiglianza con altre sequenze a funzione nota o il livello di espressione) non possono essere adottate per definire l'esatta funzione del gene e la sua espressione a livello fenotipico (Henikoff e Comai, 2003).

In passato veniva utilizzato, per stabilire la funzione di nuove sequenze geniche, un approccio di analisi denominato di “genetica diretta”, che permette di risalire dal fenotipo (es. un'alterazione morfologica) alla sequenza relativa che lo determina. Oggi sono disponibili, grazie a più efficienti tecniche di sequenziamento, una crescente quantità di sequenze, delle quali non si conosce la funzione associata. Infatti, fino ad oggi sono state pubblicate, e sono a completa disposizione della comunità scientifica, le sequenze dei genomi di *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Initiative, 2000), *Oryza sativa* (Goff *et al.*, 2002), *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006), *Vitis vinifera* (Jaillon *et al.*, 2007) e *Sorghum bicolor* (Paterson *et al.*, 2009). Di conseguenza, sono state sviluppate tecniche denominate di “genetica inversa” che, partendo dalle sequenze conosciute, tentano di risalire alla funzione delle sequenze stesse. In generale le procedure iniziano con l'acquisizione della sequenza codificante di un gene potenzialmente di interesse e si tenta poi di indurre, tramite differenti strategie di mutagenesi, alterazioni al fine di modificarne la funzionalità. Una successiva analisi fenotipica del mutante permetterà di attribuire una funzione al gene bersaglio. Il flusso

di informazioni delle due strategie di analisi genetica può essere riassunto come indicato nella figura di seguito riportata:



Disporre di una popolazione di varianti (naturali od indotte artificialmente) è il primo passaggio sia per analisi di genetica diretta che inversa.

- Genetica diretta. si inizia con la selezione di un processo biologico od un aspetto morfo-fisiologico di interesse a cui segue il vaglio della popolazione per l'individuazione di fenotipi alterati. L'ultima fase è l'identificazione e il clonaggio del gene/i responsabile della mutazione/variazione fenotipica.
- Genetica inversa. si parte con la selezione di uno o più geni a sequenza nota ma a funzione ignota. Segue uno screening molecolare sequenza-specifico per individuare varianti nella porzione genomica selezionata. L'analisi fenotipica delle varianti individuate consentirà di associare alla variazione di sequenza una variazione morfo-fisiologica.

2.1 STRATEGIE DI GENETICA INVERSA

Diverse sono le metodologie proposte per studi di genetica inversa; per semplicità possono essere raggruppate in:

1) Strategie nelle quali il bersaglio della mutagenesi è uno specifico *locus* di interesse; in questo caso parleremo di tecniche basate su mutagenesi mirata. Purtroppo queste tecniche non sono ancora state affinate per il loro utilizzo in organismi eucariotici multicellulari. Tutte queste tecniche si basano sulla trasformazione genetica che non è facilmente applicabile a tutte le specie. In particolare, utilizzando tecniche di ricombinazione omologa, si sono ottenuti successi solo in poche specie modello quali *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* e in campo vegetale nella briofita *Physcomyrella Patens* (Shaefer *et al.*, 2000) in *Arabidopsis thaliana* (Beetham *et al.*, 1999; Kempin *et al.*, 1997) e recentemente in *Oryza sativa* (Iida e Terada., 2004).

2) Strategie nelle quali è prevista la realizzazione di una popolazione mutagenizzata in maniera aspecifica, seguita da un'analisi effettuata su specifici geni; queste saranno indicate come tecniche basate su mutagenesi casuale. A questo scopo esistono tre strategie principali utilizzate per indurre mutazioni casuali all'interno di un genoma: la mutagenesi inserzionale, basata sull'inserzione di T-DNA e di trasposoni, la mutagenesi fisica e la mutagenesi chimica.

2.2 MUTAGENESI MIRATA IN GENETICA INVERSA

Per quanto concerne le strategie di “mutagenesi mirata” in campo vegetale, di primaria importanza sono i risultati ottenuti in *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, le uniche specie per cui la trasformazione genetica non presenta più limitazioni tecnologiche.

2.2.1 GENE TARGETING

E' la strategia di mutagenesi mirata in assoluto più precisa; si realizza inducendo la ricombinazione omologa tra la sequenza del gene bersaglio del genoma ospite ed una sequenza di DNA estranea introdotta per trasformazione genetica opportunamente modificata per essere non funzionale. Se il processo di ricombinazione omologa avviene correttamente, uno specifico gene funzionale è sostituito con una copia quasi identica ma non funzionale (Mengiste e Paszkowski, 1999). Questa tecnologia consente di modificare una specifica sequenza senza determinare cambiamenti in nessun'altra regione del genoma. Sebbene i primi tentativi abbiano dato risultati apprezzabili (Beetham *et al.*, 1999; Kepim *et al.*, 1997), la tecnica è ancora praticamente inutilizzata su larga scala in campo vegetale a causa della bassa frequenza di ricombinazione omologa (Adams *et al.*, 2002). Recenti avanzamenti tecnologici ed una miglior comprensione del meccanismo molecolare alla base della ricombinazione omologa, potrebbero rendere in futuro più semplice il suo utilizzo (Terada *et al.*, 2002; Hanin e Paskowski, 2003). Ad esempio, e' stato recentemente dimostrato che la sovraespressione in *Arabidopsis thaliana* del gene di lievito *RAD54*, coinvolto nel rimodellamento della cromatina, determina un incremento sostanziale dei trasformati per ricombinazione omologa (Shaked *et al.*, 2005). Ancora, la messa a punto di un efficiente protocollo di selezione dei trasformati basato su un sistema a "doppia selezione positiva-negativa", ha permesso di ottenere una quantità piuttosto elevata di trasformati per ricombinazione omologa per il gene della alcool deidrogenasi in *Oryza sativa* (Terada *et al.*, 2007).

2.2.2 SILENZIAMENTO GENICO

Il fenomeno è stato descritto per la prima volta in petunia da due differenti gruppi di ricerca (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990); obiettivo di entrambi i ricercatori era quello di ottenere fiori con colore più intenso introducendo nel genoma il gene della calcione sintetasi. Al contrario osservarono una riduzione di espressione sia

del gene endogeno che del gene estraneo introdotto. La tecnologia, oggi comunemente denominata “silenziamento genico”, viene utilizzata per attenuare l’espressione di specifici geni introducendo nel genoma ospite sequenze con elevata omologia. Dal punto di vista molecolare, l’espressione di elevati livelli di uno specifico dsRNA (RNA a doppio filamento) comporta la diffusione di un segnale di silenziamento genico di uno o pochi geni endogeni in maniera sequenza-specifica. Il silenziamento genico sembra essersi evoluto quasi senza modifiche in tutti gli organismi eucariotici superiori come difesa contro virus e trasposoni attivi (Robertson *et al.*, 2004). Essendo l’unica strategia di mutagenesi che agisce a livello post-trascrizionale presenta alcuni peculiari vantaggi:

1) E’ possibile ridurre l’espressione di più geni contemporaneamente (es. membri di una famiglia genica) inducendo la sovra-espressione di una sequenza comune a tutti. La tecnica è stata utilizzata per silenziare i geni della Glutatione trasferasi di *Arabidopsis thaliana* (Sappl *et al.*, 2008)

2) Il silenziamento genico è molto interessante anche per lo studio di geni essenziali per la vitalità della pianta poiché determina in genere una semplice attenuazione dell’espressione genica (Waterhouse e Helliwell, 2003).

Purtroppo, la variabilità degli effetti in specie e tessuti differenti complica enormemente l’interpretazione e la riproducibilità dei risultati ottenuti utilizzando questa strategia. Inoltre, l’espressione del transgene può variare tra piante differenti della stessa specie e tra generazioni successive.

2.2.3 NUCLEASI ZINC-FINGER

Recentemente è stata descritta una nuova metodologia che sfrutta proteine di fusione tra un dominio di riconoscimento specifico del DNA a “zinc-finger” ed un dominio nucleasico in grado di generare tagli a doppio filamento (Lloyd *et al.*, 2005). Il dominio a “zinc-finger” riconosce sequenze specifiche del DNA mentre il dominio nucleasico genera tagli introducendo mutazioni stabili. E’ stato dimostrato che l’espressione di una nucleasi “zinc-finger” sequenza specifica in *Arabidopsis thaliana* è in grado di generare

mutazioni stabili (inserzioni e delezioni) *in planta* (Lloyd *et al.*, 2005). L'ampia scelta di domini a "zinc-finger", ciascuno con differente specificità, potrebbe permettere l'uso della tecnica per indurre mutazioni in quasi tutti i geni di un organismo.

2.3 MUTAGENESI CASUALE IN GENETICA INVERSA

Una ampia scelta di mutageni fisici, chimici o biologici possono essere utilizzati per indurre alterazioni utili per studi di genetica inversa. Ciascun mutageno è caratterizzato da una diversa efficienza (numero di eventi di mutazione per genoma) e conseguenza molecolare (varia da sostituzioni a singolo nucleotide fino a inserzioni e riarrangiamento di intere porzioni cromosomiche; Feldmann *et al.*, 1994). La natura del danno a livello molecolare è strettamente correlato con l'effetto che la mutazione avrà sul fenotipo del mutante: delezioni, inserzioni e riarrangiamenti indurranno con elevata probabilità mutazioni con perdita di funzione, mentre mutazioni puntiformi avranno diversi effetti sulla funzionalità del gene (attività ridotta, attività eliminata o alterata).

2.3.1 MUTAGENESI INSERZIONALE

La tecnica della mutagenesi inserzionale consiste nell'introdurre, all'interno del genoma di una specie, nuovi tratti di DNA a sequenza nota. Questi possono determinare, se si inseriscono all'interno di una sequenza genica, la perdita della sua funzione (mutazioni "knock-out"). Sottoponendo al trattamento di mutagenesi un elevato numero di individui è teoricamente possibile ottenere inserzioni in tutte le sequenze geniche della specie sottoposta al trattamento. Le due principali strategie utilizzate a questo fine sono il "T-tagging" e il "Transposon-tagging".

T-TAGGING

La tecnica del "T-tagging" consiste nel produrre una ampia popolazione di individui mutagenizzati a seguito di trasformazione con il batterio *Agrobacterium tumefaciens*. Questo batterio possiede la capacità intrinseca di trasformare le piante attraverso la

trasmissione di un segmento di DNA (comunemente chiamato T-DNA) che penetra all'interno delle cellule vegetali e si integra in maniera casuale nel loro genoma. La tecnica del “T-tagging” è stata utilizzata con successo per studi di genomica funzionale in *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Jeon *et al.*, 2000), specie che presentano un genoma di dimensioni relativamente ridotte e per le quali è disponibile un efficiente ed economico sistema di trasformazione (Sallaud *et al.*, 2003). Il numero di eventi di trasposizione, e quindi di inserzione del T-DNA, deve essere molto alto (dell'ordine delle decine di migliaia) al fine di garantire una discreta probabilità che un qualsiasi locus genico sia stato interessato in almeno un caso (Kolesnik *et al.*, 2004; Sallaud *et al.*, 2004). Per contro, si possono verificare eventi di inserzione complessi (riarrangiamenti cromosomici o inserzioni a copia multipla) che rendono più complicata l'analisi genetica dei trasformati.

TRASPOSON-TAGGING

Gli elementi trasponibili, o trasposoni, sono particolari sequenze di DNA dotate di mobilità capaci, cioè, di trasferirsi da una regione all'altra del genoma (McClintock, 1953). Tale capacità viene sfruttata per generare dei mutanti da inserzione; su queste basi si fonda la tecnica del “Transposon-tagging”. Una categoria di elementi trasponibili, ampiamente utilizzati in programmi di “tagging” nei vegetali, sono stati individuati inizialmente nel genoma di *Zea mays*. Questi trasposoni sono raggruppabili in famiglie in cui si distinguono elementi autonomi, dotati della capacità intrinseca di escindersi e trasporarsi, e elementi non autonomi o difettivi. Questi ultimi sono incapaci di trasporarsi autonomamente e necessitano della presenza di un elemento autonomo, della stessa famiglia, che fornisca “in-trans” le funzioni necessarie alla trasposizione. Tra le famiglie di elementi trasponibili maggiormente utilizzate per programmi di “Transposon-tagging” dei vegetali troviamo la Ac/Ds, la Spm/dSpm. Gli elementi trasponibili Ac e Spm sono i membri autonomi delle due famiglie mentre Ds e dSpm sono, invece, quelli non autonomi. Queste famiglie possono essere trasferite nel genoma di altre specie, dove la trasposizione dei singoli elementi determina la produzione di mutanti da inserzione. Se l'evento di inserzione avviene all'interno di

una sequenza genica, può essere alterata l'espressione del gene e quindi può verificarsi un effetto rilevabile fenotipicamente (Maes *et al.*, 1999). La famiglia Ac/Ds è stata ampiamente utilizzata per programmi di "Transposon-tagging" in sistemi eterologhi: *Arabidopsis thaliana* (Parinov *et al.*, 1999), *Oryza sativa* (Izawa *et al.*, 1997) e *Hordeum vulgare* (Koprek *et al.*, 2000, Cooper *et al.*, 2004), oltre che ampiamente in *Zea mays* (Bruntell, 2002). La famiglia Spm/dSpm è invece stata utilizzata quasi esclusivamente in *Arabidopsis thaliana* (Speulman *et al.*, 1999; Tissier *et al.*, 1999).

Un'altra classe di elementi trasponibili utilizzati in programmi di "Transposon-tagging" sono i retrotrasposoni. Questi elementi sono presenti in tutte le specie vegetali ed in quantità molto elevate in piante con genoma ampio e complesso. La principale differenza rispetto ai comuni trasposoni risiede nel particolare meccanismo di trasposizione: il retrotrasposone viene trascritto in una forma intermedia a RNA e, successivamente, una trascrittasi inversa, codificata dall'elemento, retrotrascrive la sequenza in una forma definitiva a DNA che viene integrata in un nuovo sito del genoma. La tecnica del "Transposon-tagging" mediante retrotrasposoni è stata inizialmente utilizzata su *Drosophila melanogaster* (Bingham *et al.*, 1981) e lievito (Smith *et al.*, 1996). Nonostante l'abbondanza di questi elementi nelle piante, solo una piccola porzione di retrotrasposoni sembra essere attiva. In relazione alla loro frequenza di trasposizione Tnt1, Tto1 di *Nicotiana tabacum* e Tos17 di *Oryza sativa* sembrano essere i soli adatti al tagging nei vegetali (Kumar e Bennetzen, 1999). In particolare il retrotrasposone Tos17 è stato già utilizzato in programmi di genetica inversa di *Oryza sativa* (Hirochika, 1999).

ANALISI MOLECOLARE DEI MUTANTI INSERZIONALI

Una popolazione mutagenizzata con elementi inserzionali può essere sottoposta ad analisi, al fine di rintracciare la pianta che porta l'elemento di inserzione all'interno del gene di interesse, tramite due principali approcci molecolari.

Un primo metodo, già applicato in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Petunia parodii*, *Zea mays*, *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* (Hirochika, 2001), si basa su uno screening PCR. Vengono utilizzati a questo scopo un primer

specifico per un gene target, di cui è nota la sequenza, ed un primer specifico per la sequenza di inserzione. Avviene così l'amplificazione solo quando l'inserito è situato all'interno o in prossimità della sequenza di interesse. Grazie all'elevata sensibilità e specificità della tecnica PCR, questo tipo di analisi può essere condotta su pool molto ampi di individui e permette una considerevole riduzione del numero di campioni da sottoporre ad analisi. Ad un eventuale risultato positivo all'interno del pool, seguirà la ricerca del singolo campione portante l'inserzione (Speulman *et al.*, 1999). Un secondo metodo prevede il sequenziamento sistematico per un gran numero di piante delle regioni di DNA fiancheggianti l'inserito. Per *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, specie nelle quali è già implementata tale strategia, sono stati creati database "Tag & Sequence" (TES) contenenti le informazioni di sequenza che possono poi essere confrontate in maniera automatica e veloce con sequenze di interesse per i singoli ricercatori. Tale risorsa riduce tutte le fasi di analisi e ricerca di uno specifico mutante ad una semplice ricerca in database. TES per *Arabidopsis thaliana* sono state create sia utilizzando il T-DNA che elementi Ds (Ortega *et al.*, 2002) e in *Oryza sativa* utilizzando solo il T-DNA (An *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2004).

2.3.2 MUTAGENESI FISICA: DELETAGENE

La "Deletagene" è una strategia di genetica inversa che si avvale di un approccio molecolare basato su PCR per identificare, in un pool di campioni, mutazioni indotte da radiazioni ionizzanti ad alta energia o neutroni veloci (Li *et al.*, 2001). L'amplificazione PCR viene realizzata con una coppia di primer fiancheggiante un gene di interesse ed è seguita dalla visualizzazione dei frammenti mediante elettroforesi. La visualizzazione di un amplificato di dimensioni ridotte rispetto all'atteso indica la presenza di una delezione indotta dal trattamento mutageno. La tecnica presenta alcuni vantaggi peculiari derivati dall'utilizzo della mutagenesi fisica:

- 1) è facilmente applicabile in specie per cui non sono disponibili protocolli efficienti di trasformazione.

2) è possibile, con un solo evento di mutagenesi, eliminare un gruppo di geni in stretta associazione (es geni ripetuti in tandem; Li *et al.*, 2002).

Nonostante i considerevoli vantaggi, la tecnica non è mai stata utilizzata per analisi di genetica inversa su larga scala; uno dei pochi risultati applicativi è stata l'individuazione di mutazioni in alcuni geni codificanti per fattori di trascrizione di *Arabidopsis thaliana*. Una successiva analisi fenotipica ha dimostrato il loro coinvolgimento nella resistenza sistemica acquisita (Zhang *et al.*, 2003). È stata sviluppata una popolazione "Deletagene" anche in *Oryza sativa* al fine di identificare mutazioni in geni coinvolti nella resistenza a patogeni (Manosalva *et al.*, 2003); l'analisi molecolare ha consentito di identificare mutazioni in due differenti geni della Fenilalanina Ammonio Liasi (PAL) enzima chiave nella biosintesi dei composti fenolici. La mancata diffusione della tecnica è forse dovuta alla simultanea comparsa di nuove e più efficienti strategie di genetica inversa basate su mutagenesi chimica.

2.4 MUTAGENESI CHIMICA IN GENETICA INVERSA: IL TILLING

Recentemente è stata sviluppata una nuova strategia di genetica inversa denominata TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes), che combina mutagenesi chimica e "screening" molecolare basato sulla reazione PCR su un'ampia popolazione di individui, al fine di identificare nuove varianti alleliche prodotte dal trattamento mutageno (McCallum *et al.*, 2000). Mutageni chimici opportuni, quali l'EMS (Etil metan solfonato) o l'azide sodica, inducono principalmente mutazioni geniche puntiformi e permettono quindi, a differenza della mutagenesi inserzionale, di ottenere una serie di varianti alleliche per locus risultanti in una alterazione o una perdita di funzione (knockout mutation; Henikoff e Comai, 2003). Inoltre, l'elevata densità con cui sono indotte queste mutazioni rendono la tecnica applicabile anche a sequenze geniche di dimensioni ridotte. Un altro aspetto vantaggioso della mutagenesi chimica è la sua applicabilità alla maggior parte delle specie in quanto non richiede efficienti protocolli di trasformazione e rigenerazione. Per queste caratteristiche il TILLING

rappresenta una strategia tra le più promettenti per studi di genomica funzionale nelle piante.

Per quanto concerne l'analisi molecolare, la prima fase di un saggio TILLING consiste in una amplificazione PCR della sequenza bersaglio effettuata su una miscela di DNA genomici estratti da diverse piante mutagenizzate. Una successiva fase di denaturazione e rinaturazione consente poi la formazione di molecole eteroduplex tra ampliconi provenienti da campioni differenti. Nel caso sia presente all'interno della miscela (pool) una variante indotta dal trattamento mutageno, si ha la formazione di appaiamenti imperfetti a singolo nucleotide. Segue una digestione enzimatica con una particolare nucleasi in grado di riconoscere come siti di restrizione gli appaiamenti imperfetti a singolo a nucleotide con la formazione di frammenti a basso peso molecolare. La visualizzazione dei frammenti ottenuti avviene tramite una elettroforesi su gel denaturante o, in alternativa, con elettroforesi capillare. In presenza di un risultato positivo il DNA genomico di ogni singolo componente del pool viene miscelato con una uguale quantità di DNA genomico del "wild-type" e sottoposto alle varie fasi di analisi molecolare precedentemente descritte. In questo modo è possibile identificare il singolo campione portante la mutazione. La presenza della mutazione puntiforme viene infine verificata tramite sequenziamento. Una descrizione più dettagliata degli aspetti tecnici della strategia TILLING sarà riportata in seguito.

Prima di procedere con l'analisi delle differenti fasi della strategia TILLING, risulta opportuno mettere a confronto nella seguente tabella le principali strategie di genetica inversa utilizzate in campo vegetale. Per ciascuna tecnica sono stati riportati i vantaggi e gli svantaggi che la caratterizzano e la contraddistinguono dalle altre strategie.

TECNICA	VANTAGGI	SVANTAGGI
MUTAGENESI MIRATA		
Ricombinazione Omologa	<ul style="list-style-type: none"> • Consente di alterare un gene specifico • Induce mutazioni stabili 	<ul style="list-style-type: none"> • Bassissima efficienza in specie vegetali • Strategia basata su

		trasformazione genetica
Silenziamento genico	<ul style="list-style-type: none"> • Effetti differenti sulla funzionalità della proteina (è possibile studiare geni essenziali) • E' possibile restringere l'analisi a specifici tessuti o stadi di sviluppo • Studi di famiglie geniche 	<ul style="list-style-type: none"> • E' impossibile prevedere il livello di silenziamento • Mutazioni instabili • Strategia basata su trasformazione genetica
Nucleasi zinc-finger	<ul style="list-style-type: none"> • Consente di alterare un gene specifico • Induce mutazioni stabili 	<ul style="list-style-type: none"> • Strategia basata su trasformazione genetica • Bassa efficienza • Utilizzata solo a livello sperimentale
MUTAGENESI CASUALE		
Mutagenesi inserzionale	<ul style="list-style-type: none"> • Alta efficienza • Possono essere indotte mutazioni a perdita di funzione od acquisto di funzione • Induce mutazioni stabili 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutagenesi casuale • Non utilizzabile per lo studio di geni essenziali • Strategia basata su trasformazione genetica
DELETAGENE	<ul style="list-style-type: none"> • Consente l'analisi di più geni in stretta associazione • Non è richiesta trasformazione genetica (applicabile a tutti gli organismi) • Mutazioni stabili 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutagenesi casuale • Induce solo mutazioni con perdita di funzione
TILLING	<ul style="list-style-type: none"> • Alta efficienza • Induce mutazioni con un ampio spettro di effetti sul fenotipo (è possibile lo studio di geni essenziali) • Non richiede trasformazione genetica (applicabile a tutti gli organismi) • Mutazioni stabili 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutagenesi casuale

2.4.1 PRODUZIONE DI UNA POPOLAZIONE MUTAGENIZZATA

La realizzazione di una adeguata popolazione di mutanti è un aspetto di primaria importanza per l'ottenimento di una buona risorsa TILLING. In effetti, le scelte attuate in sede di mutagenesi chimica avranno ripercussioni su tutte le fasi successive e sulla qualità della risorsa. In questa prima fase, è indubbiamente fondamentale il conseguimento di una elevata frequenza di mutazione pur mantenendo bassi il livello di letalità ed il livello di sterilità.

Di primaria importanza nella strategia TILLING sono quindi la scelta della specie da sottoporre a trattamento e del mutageno da utilizzare.

2.4.1.1 SCELTA DELLA SPECIE

Le specie ideali per l'analisi TILLING hanno un genoma diploide, piccolo, povero in sequenze ripetute e ricco di sequenze codificanti; in generale, quindi, un genoma molto semplice. In tali specie le mutazioni puntiformi interessano con maggiore probabilità sequenze geniche ed hanno con maggiore frequenza una ripercussione sul fenotipo (Caldwell *et al.*, 2004). Tuttavia, la grande maggioranza dei genomi degli organismi eucariotici, in particolare dei vegetali, sono caratterizzati da un elevato grado di complessità; presentano geni ripetuti in tandem, famiglie geniche, elevata quantità di sequenze ripetute e geni interrotti da lunghe sequenze non codificanti. Inoltre, l'evoluzione di molte specie vegetali è avvenuta in seguito a parziale o totale duplicazione del genoma (Bowers *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2006). Ad esempio, il genoma di frumento, una delle specie maggiormente coltivate, è interamente duplicato (Feuillet e Keller, 2002). Per le analisi TILLING sarebbe preferibile impiegare delle specie simili dal punto di vista evolutivo ma con un genoma più semplice. Tali specie sono considerate dei "modelli" per determinate classi filogenetiche (ad esempio ricordiamo l'orzo per le *Triticae*).

L'analisi molecolare è altresì complicata dall'elevato grado di eterozigosi che contraddistingue quasi tutti i genomi degli organismi superiori; risulta difficile

distinguere tra mutazioni indotte e polimorfismi preesistenti. L'eterozigosi è un aspetto che complica l'analisi molecolari ma non è da considerare un problema insormontabile. In effetti, buoni risultati sono stati ottenuti anche in specie altamente eterozigoti, come ad esempio *Drosophila melanogaster* (Winkler *et al.*, 2004) e *Danio rerio* (Draper *et al.*, 2004; Wienholds *et al.*, 2003). In questi casi è buona regola attuare il trattamento di mutagenesi su pochi individui molto simili tra loro (o preferibilmente solo uno) al fine di ridurre il più possibile la variabilità genetica iniziale (Comai e Henikoff, 2006).

2.4.1.2 SCELTA DEL MUTAGENO CHIMICO

Numerosissime informazioni, circa le caratteristiche dei principali agenti mutageni e dei protocolli per il loro utilizzo, sono oggi a disposizione della comunità scientifica grazie all'ampio utilizzo della mutagenesi sia per il miglioramento genetico delle specie agrarie sia per analisi di genetica diretta. Alcuni dei principali agenti mutageni (chimici e fisici) utilizzati nel settore vegetale, i loro effetti prevalenti ed il loro impiego in esperimenti di genetica inversa sono elencati nella tabella di seguito riportata:

AGENTE MUTAGENO	CATEGORIA	EFFETTO	UTILIZZO
Raggi UV	Mutageno fisico	Dimeri di pirimidine ed errori nella replicazione	Non utilizzato
Raggi-X, Raggi gamma	Mutageno fisico	Ionizzazione di molecole organiche con formazione di radicali che causano rotture nel DNA e alterazione nelle purine e pirimidine	Deletagene
Neutroni veloci	Mutageno fisico	Danni consistenti al DNA	Deletagene
2-amminopurina5-bromouracile	Mutageno chimico	Appaiamento errato della basi azotate: induce transizioni da A/T a G/C	Non utilizzato
Bromuro di etidio, Proflavina, Arancio	Mutageno chimico	Agenti intercalanti: causano delezioni, inserzioni e spostamento del modulo di	Non utilizzato

acridina		lettura	
EtilMetanSulfonato (EMS)	Mutageno chimico	Modificazione della Guanina: induce transizioni G/C in A/T	TILLING
N-Etil-N-Nitrosurea (ENU)	Mutageno chimico	Modificazioni delle Timina: induce transizioni A/T in T/A	TILLING
Acido Nitroso	Mutageno chimico	Modificazioni della Citosina: induce transizioni A/T in G/C	Non utilizzato
Idrossilammina	Mutageno chimico	Modificazioni della Citosina: induce transizioni G/C in A/T	Non utilizzato
Azide sodica	Mutageno chimico	Meccanismo di azione non noto	TILLING

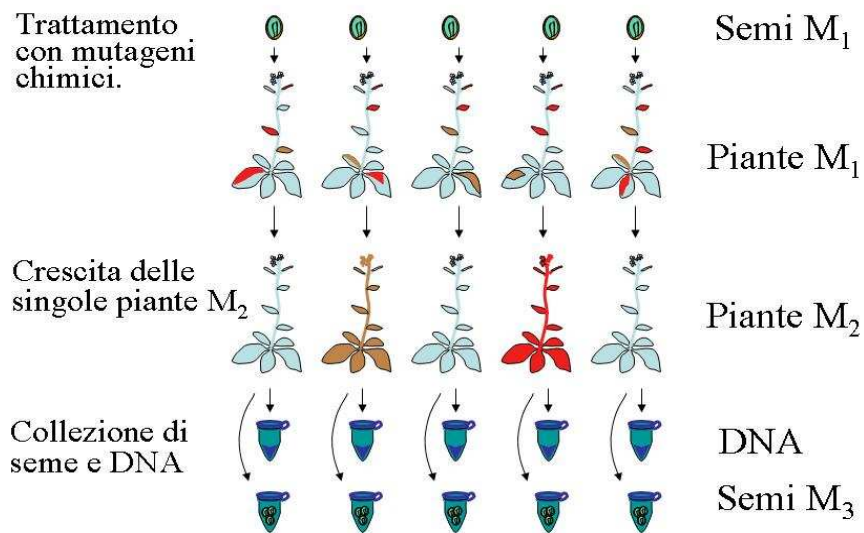
La frequenza di mutazione indotta in una specie di interesse è il primo aspetto che deve essere considerato per la scelta di un mutageno chimico (Henikoff e Comai, 2003). Come regola generale, un mutageno è da considerarsi efficace se induce un numero elevato di mutazioni per genoma. Per questa ragione, la sostanza maggiormente utilizzata per analisi TILLING in campo vegetale è stato l'Etil-Metan-Sulfonato (EMS), un mutageno chimico che produce un numero molto elevato di transizioni nel genoma delle piante. Inoltre, l'EMS introduce pochissime alterazioni cromosomiche ed ha un effetto molto limitato sulla fertilità e la vitalità delle piante (Henikoff e Comai, 2003). L'EMS induce un'ampia gamma di alterazioni: prevalentemente mutazioni puntiformi e, in percentuale molto inferiore, piccole inserzioni e delezioni (Greene *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2003). Dal un punto di vista biochimico agisce alchilando residui di guanina e determina un appaiamento errato: la guanina alchilata riconosce come nucleotide complementare una timina così da indurre transizioni in direzione G/C-A/T. Un esperimento di genetica inversa condotto su 192 geni di *Arabidopsis thaliana* ha messo in evidenza che il 99% delle mutazioni indotte da EMS sono transizioni G/C-A/T (Greene *et al.*, 2003). L'EMS ha dato ottimi risultati in varie specie vegetali: *Arabidopsis thaliana* (McCallun *et al.*, 2000), *Hordeum vulgare* (Calwell *et al.*, 2004), *Lotus japonicus* (Perry *et al.*, 2003), *Triticum spp.* (Slade *et al.*, 2005), *Zea mays* (Till *et al.*, 2004) e *Oryza sativa* (Till *et al.*, 2007). Solo di recente è stato impiegata anche l'azide sodica (NaN₃) per analisi TILLING, sia da

sola (Talamè *et al.*, 2008) che in combinazione con Metilnitrosurea (MNU) (Till *et al.*, 2007). Esistono comunque molte altre sostanze con simili caratteristiche, fra le quali si ricorda l’N-Etil-N-Nitrosurea (ENU) utilizzato per produrre una popolazione mutagenizzata in *Danio rerio* (Draper *et al.*, 2004; Stemple, 2004).

2.4.1.3 TRATTAMENTO MUTAGENO

Per un corretto trattamento di mutagenesi è necessario individuare la concentrazione più opportuna di agente mutageno, in modo da indurre un numero elevato di mutazioni ma di limitare gli effetti sulla letalità e sterilità delle piante (Henikoff e Comai., 2003). Per la maggior parte delle specie di interesse agrario sono oggi disponibili in letteratura molte informazioni riguardanti protocolli efficienti di mutagenesi. Se non sono fruibili queste informazioni risulta indispensabile saggiare differenti concentrazioni di mutageno al fine di identificare la più adeguata alle proprie esigenze. Il livello di letalità, sterilità ed il grado di chimerismo (settori della pianta privi di pigmento) sono indicatori che possono fornire un’idea dell’efficacia del trattamento (Kleinhofs e Smith, 1976).

Ad oggi, nella maggior parte dei progetti TILLING, l’organo riproduttivo scelto per essere sottoposto al trattamento mutageno è il seme (comunemente denominato generazione M_0). Come già sottolineato, essendo l’embrione un organo pluricellulare, ogni singola cellula è soggetta ad eventi di mutazione indipendentemente dalle altre. Le piante originate dal seme M_0 sono quindi di natura chimerica (generazione M_1) e non adatte ad essere sottoposte al saggio molecolare; inoltre, molte delle mutazioni identificate a livello dei tessuti somatici non sarebbero trasmesse alla discendenza. In seguito ad autofecondazione delle piante M_1 , le mutazioni che interessano i tessuti riproduttivi verranno ereditate dalla progenie (generazione M_2) che risulterà geneticamente uniforme in tutti i tessuti. Gli individui M_2 sono quindi adatti ad essere sottoposti al saggio molecolare, poiché tutti polimorfismi identificati saranno ereditati dalle successive generazioni (Henikoff e Comai, 2003).



Concessione di L. Comai

In alternativa al seme, è possibile effettuare il trattamento mutageno sul polline. La mutagenesi pollinica può essere preferibile sotto diversi punti di vista:

- La possibilità di ottenere, già dalla prima generazione M_1 , piante geneticamente omogenee (non chimeriche). Le piante M_1 possono essere analizzate perché tutte le mutazioni identificate saranno trasmesse alle successive generazioni.
- L'utilizzo del polline consente di lavorare con un numero considerevolmente elevato di individui in uno spazio molto ridotto e con costi piuttosto contenuti.

Ad oggi, la mutagenesi del polline per applicazioni TILLING è stata condotta solo in *Zea mays* (Till *et al.*, 2004), una specie monoica diclina in cui l'infiorescenza maschile e femminile hanno origine da cellule embrionali del seme differenti. In questo caso, una mutazione indotta per trattamento del seme, non segregherà nella progenie M_2 ottenuta per autofecondazione, perché presente in solo uno dei due gameti. Di conseguenza le mutazioni recessive inizieranno ad essere visibili solo a partire dalla generazione M_3 (Koornnef *et al.*, 2002). In mais, il trattamento del polline consente quindi di anticipare sia l'analisi molecolare che l'analisi dei fenotipi di una generazione (Till *et al.*, 2004).

2.4.2 SCELTA DEL GENE BERSAGLIO

Ai fini della strategia TILLING, la scelta del gene da sottoporre al saggio molecolare è senza dubbio uno degli aspetti di maggiore rilevanza. Per quanto possibile, è preferibile scegliere geni a copia singola, per evitare che l'effetto fenotipico dell'eventuale mutazione venga mascherato dall'effetto tampone da parte di altre sequenze geniche a funzione simile. Altrettanto importante è selezionare la porzione del gene da saggiare mediante PCR; tra le caratteristiche da considerare possiamo ricordare:

- 1) La lunghezza dell'amplicone. E' preferibile lavorare con porzioni del gene di elevata lunghezza (ca. 1 Kb) al fine di saggiare una estesa quantità di genoma e quindi aumentare la probabilità di individuare una mutazione puntiforme.

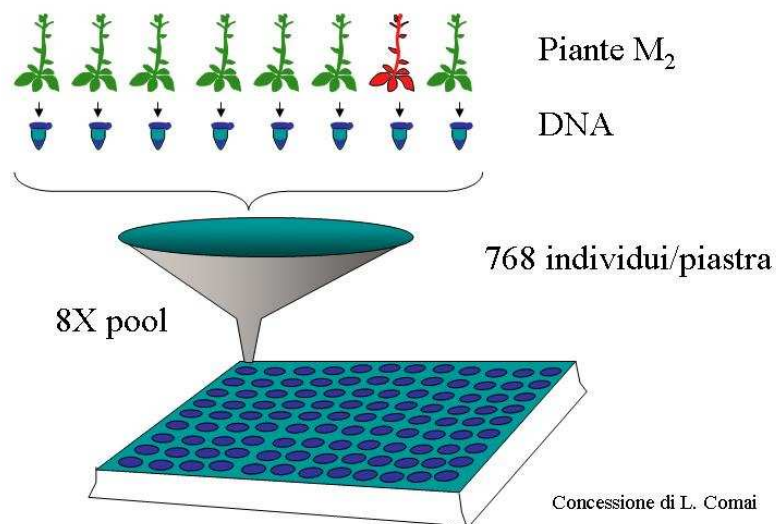
- 2) La probabilità che mutazioni puntiformi, indotte al suo interno, comportino un effetto sulla funzionalità della proteina. Per l'identificazione di questa regione è stato creato da Nicholas Taylor e Elizabeth Greene il programma CODDLE (Codons Optimized to Detect Deleterious Lesions), disponibile in rete al sito <http://www.proweb.org/coddle>. Il programma è stato sviluppato per facilitare la scelta della regione più adeguata all'analisi TILLING (Taylor e Greene, 2003). Se sono note la sequenza genomica e la posizione degli introni e degli esoni del gene oggetto di interesse, il programma CODDLE è in grado di identificare le regioni in cui eventuali mutazioni puntiformi causano con maggiore probabilità effetti deleteri sulla funzionalità della proteina. Innanzitutto, il programma calcola in ogni posizione della sequenza genica la probabilità di indurre mutazioni di-senso e non-senso in funzione del mutageno utilizzato. In secondo luogo, individua all'interno della sequenza i domini funzionali conservati in cui le mutazioni hanno con maggiore probabilità un effetto negativo sulla funzione della proteina. Come risultato finale, il programma identifica la porzione del gene più adatte all'analisi TILLING (Taylor e Greene, 2003).

2.4.3 ANALISI MOLECOLARE TILLING

Le fasi più importanti della tecnologia TILLING possono essere così riassunte: pooling, formazione di molecole eteroduplex, taglio enzimatico e visualizzazione dei frammenti.

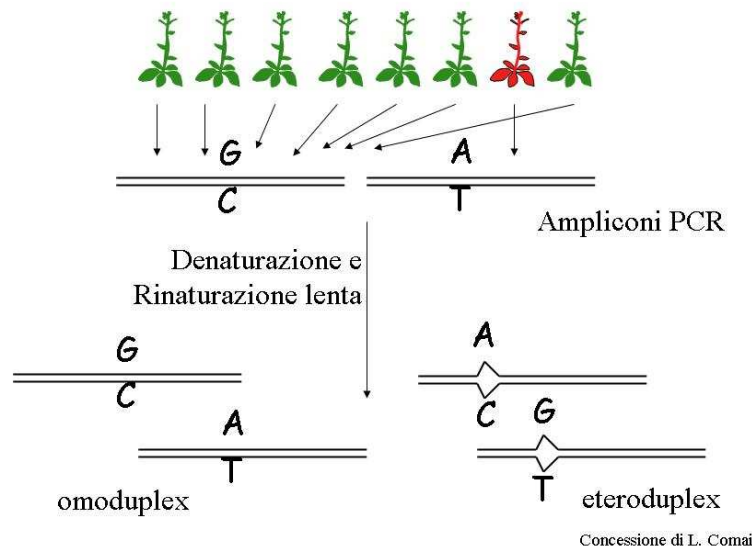
2.4.3.1 POOLING E FORMAZIONE DELL'ETERODUPLEX

Il TILLING può essere definito una strategia “high-throughput” in quanto l’analisi viene effettuata su campioni ottenuti in seguito a raggruppamento di DNA genomico di singoli campioni in un unico “campione pool”, in modo da ridurre sia la quantità di risultati negativi che il numero di campioni da sottoporre all’analisi (Henikoff e Comai, 2003). In quest’ottica, in seguito all’estrazione del DNA genomico dalle singole piante mutagenizzate, i campioni vengono organizzati in gruppi come è riportato nella seguente figura.



L’amplificazione della regione da sottoporre al saggio molecolare avviene tramite reazione PCR direttamente sui “campioni pool”. La procedura di pooling permette di avere nello stesso campione un eventuale allele mutato insieme a quello selvatico o

“wild-type”; grazie ad una fase di denaturazione e rinaturazione, si potranno formare, in aggiunta alle normali molecole omoduplex, perfettamente complementari, delle molecole eteroduplex che presentano appaiamenti imperfetti per la presenza di SNPs tra le due forme alleliche.



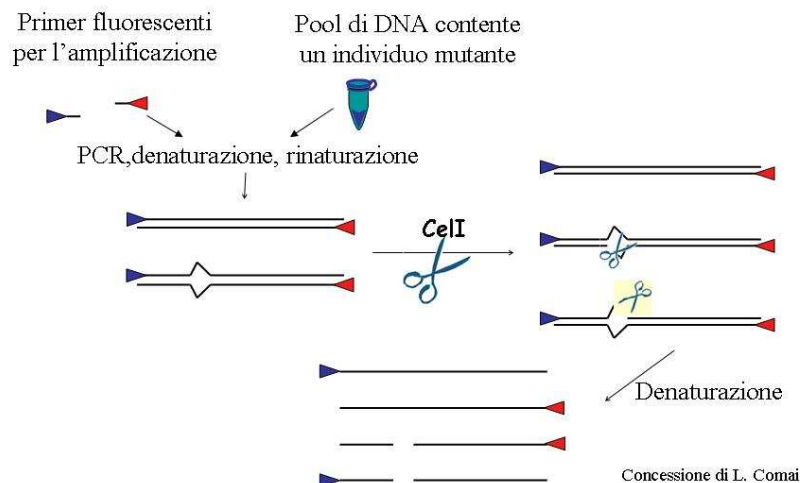
L’ampiezza del pool può essere aumentata in modo da ridurre il numero delle analisi fino a un livello tale da garantire comunque una buona sensibilità nel rilevamento delle mutazioni puntiformi indotte (Comai e Henikoff, 2006). Nella maggior parte dei progetti TILLING finora avviati, come quelli in *Arabidopsis thaliana* (Till *et al.*, 2003) o *Zea mays* (Till *et al.*, 2004), è stato utilizzato un livello di raggruppamento pari a otto. In questi casi è possibile ricercare mutazioni in 750.000 paia di basi per ciascuna corsa TILLING (Pooling 8 x 1.000 bp x 96 corsie).

In alternativa, i DNA dei singoli campioni possono essere organizzati utilizzando una strategia di pooling in due dimensioni o “pooling in 2-D”; in questo caso ogni campione di DNA viene inserito in due differenti “pool” miscelato con campioni differenti. Se è presente nel campione una mutazione puntiforme, questa verrà visualizzata su gel in due corsie separate, corrispondenti ai due “pool” in cui è presente il campione mutante. Con questa strategia è possibile identificare le cui coordinate che identificano in maniera univoca la singola pianta mutante (Parinov e Sundaresan,

2000). L'utilizzo di questa strategia implica un aumento del numero di "campioni pool" che devono essere analizzati, ma permette l'identificazione immediata del singolo campione mutante evitando il passaggio di analisi dei singoli componenti dei pool (Till *et al.*, 2006a). Questa strategia è stata utilizzata per l'identificazione di polimorfismi rari per un progetto ECOTILLING relativa alla specie umana (Till *et al.*, 2006b).

2.4.3.2 DIGESTIONE ENZIMATICA

Al fine di rilevare la presenza delle molecole eteroduplex è stato messo a punto un protocollo di digestione enzimatica seguita da corsa elettroforetica dei frammenti ottenuti. Le nucleasi appartenenti alla famiglia S1 sono caratterizzate dalla capacità di riconoscere, come siti di restrizione, appaiamenti imperfetti a singolo nucleotide e sono in grado di generare tagli a singolo filamento al loro terminale 3' (Desai e Shankar, 2003). Di conseguenza, l'incubazione di campioni contenenti molecole eteroduplex, in presenza di nucleasi della famiglia S1, comporterà la generazione di frammenti a basso peso molecolare originati dal taglio nucleasico in aggiunta al frammento intero amplificato.



Yeung e collaboratori hanno identificato una nucleasi della famiglia S1 (CelI purificato da sedano) che digerisce il DNA in corrispondenza di mancanti appaiamenti a singolo nucleotide con altissima efficienza (Oleykowski *et al.*, 1998; Yang *et al.*,

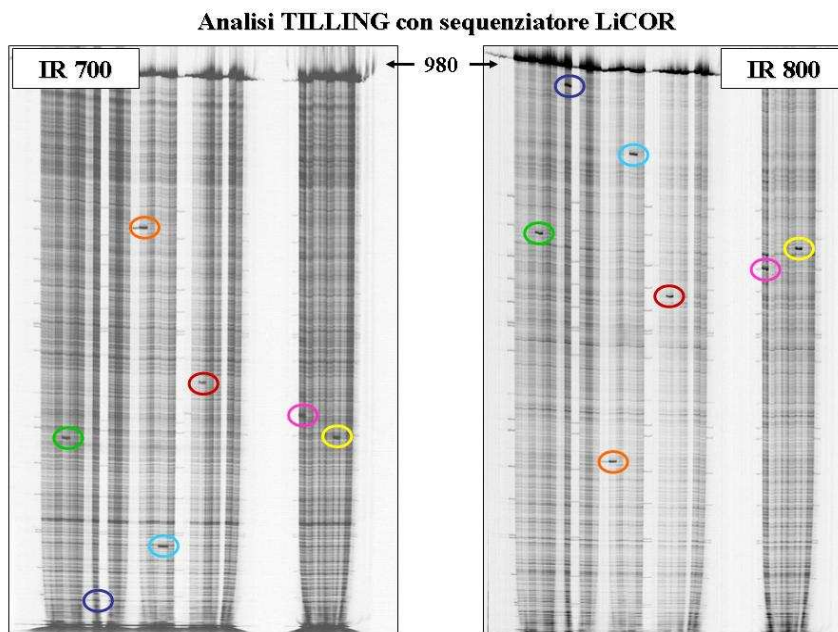
2000). Tale enzima è divenuto in breve tempo il più utilizzato per applicazioni TILLING. Sebbene inizialmente fosse disponibile solo un formulato commerciale dell'enzima (Surveyot kit Transgenomics, Inc., NE, USA) recentemente, è stato dimostrato che semplici estratti di sedano sono sufficientemente ricchi di attività endonucleasica da essere utilizzati per applicazioni TILLING (Till *et al.*, 2004).

2.4.3.3 VISUALIZZAZIONE DEI FRAMMENTI

La visualizzazione dei frammenti si realizza con l'ausilio di uno strumento elettroforetico. Ciò permette di evidenziare la presenza, oltre alla banda relativa all'amplificato intero, di ulteriori bande a peso molecolare inferiore corrispondenti ai prodotti della digestione; vengono così individuati i campioni che presentano polimorfismi SNP e la posizione approssimativa di questi ultimi.

La tecnica è stata inizialmente implementata su sequenziatore LiCOR (Li-COR Inc. 2006; <http://www.licor.com/>), uno strumento elettroforetico verticale su gel di poliacrilammide. Lo strumento LiCOR permette di effettuare la corsa elettroforetica e la visualizzazione delle bande utilizzando un sistema di rilevamento di fluorescenza. A tal fine vengono utilizzati per la reazione PCR primer marcati con due diversi fluorocromi (vedi figura digestione), la cui emissione di fluorescenza è rilevata dallo strumento e separata in due diversi canali di lettura (IR700 e IR800), così che, in presenza di SNP, i due frammenti generati dal taglio dovranno essere visibili uno in un canale e uno nell'altro e la loro somma come lunghezza corrisponderà a quella dell'amplificato non digerito. Il peso molecolare dei frammenti fornisce inoltre indicazioni circa la posizione del polimorfismo. Nella figura successiva è riportata l'immagine per i canali IR700 e IR800 di una corsa elettroforetica LiCOR condotta presso il laboratorio dell'Area di Genetica del DiSTA. Nel gel sono stati caricati sette campioni mutanti per il gene della Pullulanasi di *Hordeum vulgare* (codice GenBank AF122050). I cerchi indicano le bande generate dalla digestione dei campioni mutanti. Due cerchi dello stesso colore corrispondono alle due bande originate dal taglio enzimatico dello stesso campione mutante e visualizzate sui due canali di lettura. Per

tutte le coppie di bande evidenziate, la somma come lunghezza corrisponde alla lunghezza complessiva dell'amplificato di 980 bp.



Nonostante il LICOR sia stato lo strumento più utilizzato per l'analisi TILLING, è stato recentemente sviluppato un nuovo protocollo di analisi basato su sequenziatore capillare ABI (Applied Biosystem, CA, USA). Utilizzando per la visualizzazione dei frammenti il sequenziatore ABI, è possibile automatizzare la fase di caricamento dei campioni ed analizzare simultaneamente due differenti ampliconi grazie ad un sistema di rilevamento della fluorescenza a quattro colori (Sood *et al.*, 2006).

Una metodologia alternativa impiega un kit Transgenomics specifico per l'identificazione di polimorfismi, con un saggio per la visualizzazione dei frammenti su gel di agarosio (Qiu *et al.*, 2004). Purtroppo, gli eccessivi costi ed i limiti tecnici rendono questo protocollo utilizzabile solo in progetti su piccola scala, quali l'identificazione di polimorfismi in singoli geni (Comai e Henikoff, 2006).

Una strategia utilizzata nelle prime applicazioni della metodologia TILLING prevede invece la visualizzazione degli amplificati con la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) che consente la discriminazione diretta tra le molecole eteroduplex e le molecole omoduplex senza la fase di digestione (Bentley *et al.*, 2000;

McCallum *et al.*, 2000). La fase solida utilizzata per la DHPLC ha affinità differente per DNA a singolo e a doppio filamento in funzione della loro differente idrofobicità. La separazione cromatografica avviene mantenendo la temperatura della colonna leggermente al di sotto della temperatura di melting (T_m) della molecola omoduplex. In queste condizioni una molecola eteroduplex con un appaiamento imperfetto a singolo nucleotide è denaturata e fluirà più velocemente attraverso la colonna. Di conseguenza, ogni singolo polimorfismo comporterà una minore affinità per la matrice solida e comparirà in fase di visualizzazione come un picco di testa (Henikoff e Comai, 2003). L'approccio DHPLC è facilmente automatizzabile e veloce in quanto non necessita di marcature fluorescenti e purificazione dei frammenti. La tecnica TILLING classica offre però numerosi vantaggi:

- E' possibile analizzare frammenti di maggiore lunghezza (ca. 1000 bp) il che permette di identificare un maggiore numero di mutazioni puntiformi per singola analisi.
- Il protocollo *Cell* è trasferibile senza sostanziali modifiche a tutti gli ampliconi, mentre per l'approccio DHPLC è necessaria una nuova messa a punto per ogni sequenza (es. temperatura della colonna).

In presenza di un risultato positivo il DNA genomico di ogni singolo componente del bulk viene miscelato con una uguale quantità di DNA genomico del "wild-type" e sottoposto alle varie fasi di analisi molecolare precedentemente descritte. In questo modo è possibile identificare il singolo campione portante il polimorfismo SNP (Henikoff e Comai, 2003).

2.4.3.4 SEQUENZIAMENTO E ANALISI DELLE MUTAZIONI

La conferma dei risultati ottenuti in corsa elettroforetica tramite sequenziamento permette di stabilire l'esatta posizione e la tipologia delle mutazioni puntiformi rilevate (transizioni, transversioni), verificando così che siano state effettivamente indotte dal mutageno utilizzato (Henikoff *et al.*, 2004). Dopo l'identificazione della mutazione si

deve procedere con la stima dell'effetto della stessa sulla funzionalità della proteina. Le mutazioni di-senso e non-senso, che determinano rispettivamente un cambiamento aminoacidico e il blocco della traduzione, sono di particolare interesse per il TILLING perché hanno la possibilità di alterare la funzionalità della proteina. Altre mutazioni, dette silenti, molto probabilmente non avranno alcun effetto sulla funzione; queste includono cambiamenti in sequenze non trascritte o non tradotte o a livello della terza base del codone. L'effetto delle mutazioni non-senso è facilmente classificabile mentre l'effetto di una mutazione di-senso potrebbe non essere così ovvio. A questo scopo sono stati implementati dei programmi in grado di predire l'effetto dell'evento di mutagenesi sulla base di comparazioni con altre sequenze proteiche. Con il programma PARSESNP (Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs), accessibile in rete al sito <http://www.proweb.org/parsesnp/>, è possibile valutare il tipo di mutazione avvenuta (mutazione di-senso, mutazione non-senso) e, attraverso un complesso calcolo statistico, la probabilità che l'evento di mutagenesi abbia un effetto deleterio sulla funzionalità della proteina (Taylor e Greene, 2003). Il programma SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT>) è molto simile al precedente ed è in grado di stabilire quanto una sostituzione aminoacidica influisce sulla funzione della proteina in base a omologia di sequenza con domini funzionali noti ed in relazione alle proprietà fisiche degli aminoacidi (Ng e Henikoff, 2003).

2.5 DALL'ANALISI MOLECOLARE AL FENOTIPO

Successivamente all'identificazione delle mutazioni che potrebbero pregiudicare la funzionalità di un gene, risulta necessaria una approfondita analisi fenotipica dei genotipi mutanti al fine di verificare l'effetto della mutazione (Henikoff e Comai, 2003).

Come precedentemente illustrato, la mutagenesi chimica introduce un numero molto elevato di mutazioni puntiformi per genoma, di conseguenza, oltre alla mutazione oggetto di studio saranno presenti migliaia di mutazioni supplementari che potrebbero complicare l'analisi del fenotipo (mutazioni di background). Una possibile soluzione

prevede l'attuazione di diversi cicli di reincrocio con il genotipo non-mutato al fine di eliminare od almeno ridurre il numero delle mutazioni supplementari. Tuttavia, è possibile eludere anni di reincrocio effettuando l'analisi fenotipica di popolazioni segreganti per la mutazione di interesse (Henikoff e Comai, 2003). Ad esempio, una famiglia M_3 , ottenuta da singola una pianta M_2 eterozigote per la mutazione, esibisce i classici rapporti mendeliani di segregazione 1:2:1. Analizzando numerose piante per ogni classe genotipica, dovrebbe essere teoricamente possibile riconoscere una correlazione significativa tra genotipo e fenotipo. In questo caso le mutazioni di background possono essere distinte dalla mutazione al gene di interesse solo se non sono in stretta associazione (Henikoff e Comai, 2003).

Se viene identificata una serie di alleli mutanti per lo stesso gene bersaglio, è possibile procedere con un test di complementazione: si incrociano tra loro due linee mutanti (con mutazioni allo stesso gene) con lo scopo di ottenere una progenie etero-allelica al gene bersaglio ed eterozigote per tutte le mutazioni di background. Nella progenie, l'effetto sul fenotipo delle mutazioni supplementari non sarà visibile, in quanto mascherato dalla presenza del gene selvatico (Henikoff e Comai, 2003).

Occasionalmente, non viene individuata alcuna variazione fenotipica anche analizzando una linea mutante completamente priva di mutazioni addizionali. Questa circostanza può essere dovuta a due cause principali:

- Ridondanza funzionale tra i membri di un famiglia genica o tra geni funzione simile (Hua e Meyerowitz, 1998). Il fenomeno della ridondanza è particolarmente evidente in piante a genoma poliploide. L'analisi fenotipica di una popolazione mutagenizzata di frumento, creata da Slade e collaboratori per analisi TILLING, ha evidenziato che la maggioranza dei mutanti appaiono simili al selvatico; solo in rari casi sono stati osservati fenotipi anormali (< 0.5%). In effetti, la natura poliploide del genoma di frumento determina un forte effetto tampone sulle mutazioni indotte (Slade *et al.*, 2005). In questa circostanza, l'unica soluzione è procedere con un programma di incroci al fine di produrre un mutante multiplo (Krysan *et al.*, 1999).

- La mancanza di un fenotipo visibile può essere dovuto a fattori di tipo ambientale. Alcuni geni si sono evoluti per svolgere la loro funzione solo in particolari ambienti o solo se sottoposti a determinate condizioni di stress. In questi casi, l'effetto della mutazione sul fenotipo sarà evidente solo se si presenteranno le condizioni ambientali permissive; tali mutanti vengono comunemente denominati "mutanti condizionali" (Hirsch *et al.*, 1998). L'analisi di questi mutanti dovrebbe essere condotta in un'ampia gamma di condizioni ambientali differenti al fine di comprendere in quale aspetto dell'adattamento ambientale sia coinvolto il gene oggetto di studio (Krysan *et al.*, 1999).

Infine, per dimostrare in maniera inequivocabile che una alterazione fenotipica sia causata dalla mutazione oggetto di studio sono indispensabili ulteriori passaggi di analisi:

- Ripristinare il fenotipo selvatico attraverso un test di complementazione. E' possibile introdurre nel genoma del mutante una copia funzionale del gene mediante trasformazione genetica. Purtroppo, questa metodologia è piuttosto costosa e difficilmente applicabile in specie non modello.
- Una valida alternativa è la caratterizzazione di alleli multipli per il gene oggetto di studio. L'osservazione di caratteristiche fenotipiche simili in mutanti differenti fornisce una prova quasi certa del coinvolgimento della sequenza genica nella determinazione di quel particolare fenotipo.

2.6 ECOTILLING

Una specie vegetale può essere soggetta a processi di differenziazione dovuti ad un adattamento a particolari condizioni ambientali. In specie a riproduzione prevalentemente allogama si può originare variabilità di tipo discontinuo per adattamento ad ambienti confinati (ecotipi) o variabilità di tipo continuo dovuta alla presenza di un gradiente ambientale con la formazione di ecoclini. Le popolazioni

naturali di specie autogame sono invece costituite da una mescolanza di linee omozigoti che rimangono più o meno indipendenti nella riproduzione. La variabilità genetica è quindi contenuta “tra-linee” ed è pertanto dovuta a differenze tra genotipi omozigoti. Le differenze di DNA genomico che si riscontrano tra i diversi ecotipi o all’interno di un ecotipo sono prevalentemente di tipo SNP. Queste variazioni svolgono un ruolo di primaria importanza nell’evoluzione e diversificazione delle specie vegetali. La possibilità di utilizzare piattaforme che permettono una analisi veloce ed economicamente conveniente, potrebbe essere di grande importanza per lo studio della funzione dei geni o per studi di disequilibrio di linkage e mappaggio per associazione. Purtroppo, strategie classiche, quali il risequenziamento, risultano essere troppo costoso e inadatto per la caratterizzazione di un numero elevato di polimorfismi rari. Come alternativa è stata proposta un adattamento della strategia TILLING per l’individuazione di questi polimorfismi; la strategia prende il nome di Ecotilling (TILLING for ECOTypes; Comai *et al.*, 2004).

I passaggi tecnici della strategia Ecotilling possono essere così riassunti: il DNA genomico di differenti individui di una popolazione naturale viene miscelato con una uguale quantità di DNA genomico di un campione di riferimento, la miscela viene quindi sottoposta alle stesse fasi di analisi molecolare utilizzate per il TILLING (Comai *et al.*, 2004).

Analogamente a quanto accade per il TILLING la strategia Ecotilling permette il restringimento della fase di sequenziamento ai soli campioni risultati positivi in corsa elettroforetica. Permette inoltre di identificare diverse tipologie di polimorfismo (SNP, inserzioni e delezioni, microsatellite; Comai *et al.*, 2004). L’approccio Ecotilling è stato utilizzato per la prima volta con successo in *Arabidopsis thaliana* (Comai *et al.*, 2004). In seguito è stato applicato per la ricerca di polimorfismi in *Homo sapiens* (Till *et al.*, 2006), *Populus balsamifera* (Gilchrist *et al.*, 2006) e *Cucumis melo* (Nieto *et al.*, 2007). Nella seguente tabella sono elencati i principali progetti Ecotilling avviati in campo vegetale

SPECIE	GENI	ISTITUTO/UNIVERSITA'
<i>Hordeum vulgare</i>	Drought toleranr genes (<i>Dhn</i>)	Institute Jordbrugsvidenskab Danimarca
<i>Hordeum vulgare</i>	Geni di reistenza a Barley yellow mosaic virus e barley mild mosaic virus (<i>rym4</i> e <i>rym5</i>)	Leibniz Institute of Plant genetics e IPK Gaterslaben, Germania
<i>Hordeum vulgare</i>	Geni di resistenza a stress biotici e abiotici	Scottish Crop Research Intitute, UK
<i>Oryza sativa</i>	Geni di resistenza allo stress idrico (<i>DREB2</i> , <i>TPP</i> , <i>ERF3</i>)	International Rice research Intitute, Filippine; Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA
<i>Oryza sativa</i>	Geni <i>Alk</i> e <i>waxy</i>	Texas Argicultural Experiment Station, USA
<i>Sorghum bicolor</i>	Geni di resistenza a stress biotici e abiotici	International Rice Research Institute, Filippine
<i>Zea mays</i>	Geni di resistenza a stress biotici e abiotici	Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA Purdue University, USA

2.7 ESEMPI DI APPLICAZIONE DELLA STRATEGIA TILLING

Caratterizzata da relativa semplicità, rapidità e universalità di applicazione, la tecnica TILLING è stata negli ultimi anni utilizzata su un grande numero di specie sia vegetali che animali. Si riportano alcuni casi emblematici:

- *Arabidopsis thaliana* è stata la prima specie ad essere sottoposta ad analisi molecolare TILLING. E' stata creata una popolazione mutagenizzata per essere resa disponibile alla comunità scientifica. I gruppi di ricerca interessati possono richiedere di effettuare sulla popolazione uno screening per una sequenza di interesse. Il progetto prende il nome di Arabidopsis TILLING Project (ATP). Già nel primo anno di servizio da parte dell'ATP, oltre 100 sequenze, delle dimensioni di circa 1000 bp sono state sottoposte ad analisi (Till *et al.*, 2003).

- In *Lotus japonicus*, pianta leguminosa modello, è stata ottenuta una popolazione mutagenizzata. Questa specie rende possibile lo studio di aspetti fisiologici particolari quali la simbiosi con il batterio *Rhizobium* e funghi micorrizici. Un primo screening sulla popolazione è stato effettuato con il gene *SYMRK*, implicato nella instaurazione del rapporto simbiotico con *Rhizobium* (Perry *et al.*, 2003).
- In frumento duro (cv. *Kronos*) e tenero (cv. *Express*) si sono ottenute, tramite trattamento chimico, una serie di varianti alleliche per i geni *waxy*, responsabili della presenza di amilopectina nelle cariossidi. Grazie alla poliploidia della specie è stato possibile ottenere una frequenza di mutazione molto elevata senza compromettere la vitalità degli individui. Risulta però difficile l'ottenimento di varianti fenotipiche, il che rende complesso l'utilizzo della popolazione per un'analisi di genetica inversa (Slade *et al.*, 2005).
- Anche in *Zea mays* è stata dimostrata l'applicabilità della tecnica TILLING. Per questa specie è stata creata una popolazione mutagenizzata resa disponibile alla comunità scientifica (Maize TILLING Project). Al sito <http://genome.purdue.edu/maizetilling> è possibile richiedere uno screening delle popolazione per un gene di interesse (Till *et al.*, 2004).

In tabella sono riassunti i principali progetti TILLING avviati in campo vegetale:

PROGETTO	SPECIE	SITO	REFERENZA
Arcadia Biosciences	<i>Triticum aestivum</i> <i>Triticum durum</i>	http://www.arcadiabiosciences.com/OurToolbox.htm	Slade <i>et al.</i> , 2005
Canadian TILLING Initiative	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica napus</i> <i>Brassica oleracea</i>	http://www.botany.ubc.ca/can-till/	Himelblau <i>et al.</i> , 2009
GABI-TILLING	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Solanum tuberosum</i>	http://www.gabi-till.de/project/project/gabi-till-project.html	
Lotus TILLING	<i>Lotus japonicus</i>	http://www.lotusjaponicus.org/tillingpages/homepage.htm	Perry <i>et al.</i> , 2003
Maize TILLING Project	<i>Zea mays</i>	http://genome.purdue.edu/maize_tilling/	Till <i>et al.</i> , 2004
OPTIWHEAT	<i>Triticum durum</i>	http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/cpi/optiwheat/indexcontent.html	

Rice TILLING Project	<i>Oryza sativa</i>	http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Main_Page	Till <i>et al.</i> , 2007
Seattle TILLING Project	<i>Arabidopsis thaliana</i>	http://tilling.fhcrc.org:9366/	Till <i>et al.</i> , 2003
Shanghai RAPESEED Database	<i>Brassica napus</i>	http://rapeseed.plantsignal.cn/	Wu <i>et al.</i> , 2007
Soybean Mutation Project	<i>Glycine max</i>	http://www.soybeantilling.org/	Cooper <i>et al.</i> , 2008
TILLMore	<i>Hordeum vulgare</i>	http://www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/	Talamè <i>et al.</i> , 2008
UTILLdb	<i>Pisum sativum</i>	http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb	Dalmais <i>et al.</i> , 2008

2.7.1 RISORSE TILLING IN ORZO

Presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali (DiSTA) è stata ottenuta una popolazione mutagenizzata di orzo cv. Morex da utilizzare come risorsa per analisi di genetica inversa mediante TILLING (Talamè *et al.*, 2008). Come agente mutageno per il trattamento si è scelta l'azide sodica (NaN₃) considerando i numerosi dati riportati in letteratura che la indicano come uno dei mutageni chimici più efficaci in orzo (Nilan *et al.*, 1973) dove è in grado di indurre con alta frequenza vari tipi di mutazioni. La popolazione mutagenizzata realizzata secondo quanto descritto rappresenta la prima risorsa per analisi di genetica inversa mediante TILLING in orzo disponibile in Italia.

A livello Europeo invece, una risorsa analoga è già stata sviluppata presso lo "Scottish Crop Research Institute" da Caldwell e collaboratori (2004) dove è stata ottenuta una popolazione mutagenizzata di orzo per studi sia di genetica diretta che inversa mediante TILLING; in questo caso si è usata però la cultivar Optic, un tipo distico molto diffuso nel Nord Europa per la produzione di malto, e il trattamento di mutagenesi è stato eseguito con EMS. La scelta dell'EMS nel lavoro di Caldwell è stata dettata dal fatto che questo agente chimico induce un'alta frequenza di mutazione in molte specie vegetali probabilmente in modo indipendente dall'ampiezza del genoma (Greene *et al.*, 2003; Henikoff e Comai, 2003). Questo permette di utilizzare una popolazione di dimensioni non eccessive. Al fine di dimostrare l'idoneità della popolazione, come risorsa utilizzabile per studi di genetica inversa, sono stati sottoposti

ad analisi molecolare TILLING due geni, specificatamente *Hordoindolina-a (Hin-a)* e *Hordeum vulgare Floral Organ Regulator-1 (HvFor1)* (Caldwell *et al.*, 2004).

Infine, una popolazione TILLING in orzo è stata prodotta presso l'istituto IPK di Leibniz da Gottwald e collaboratori (popolazione "GABI-TILLING"). La popolazione è stata ottenuta per mutagenesi con EMS della cultivar distica Barke utilizzata per la produzione di malto da birra. Tra i geni a cui è stata sottoposta ad analisi molecolare la popolazione GABI-TILLING è di notevole importanza il gene *vrs1* (Komatsuda *et al.*, 2007) coinvolto nella conversione degli orzi da polistici a distici. Delle 30 mutazioni identificate mediante analisi TILLING, tre mostrano effettivamente un fenotipo polistico (Gottwald *et al.*, 2008).

Nella seguente tabella sono stati elencati i tre progetti pubblicati di TILLING in *Hordeum vulgare*:

PROGETTO	SPECIE	SITO	REFERENZA
SCRI Barley mutants	<i>Hordeum vulgare</i> (cv <i>Optic</i>)	http://germinate.scri.sari.ac.uk/barley/mutants/	Caldwell <i>et al.</i> , 2004
GABI-TILLING	<i>Hordeum vulgare</i> (cv. <i>Barke</i>)	http://www.gabi-till.de/project/project/gabi-till-project.html	Gottwald <i>et al.</i> , 2008
TILLMore	<i>Hordeum vulgare</i> (cv. <i>Morex</i>)	http://www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/	Talamè <i>et al.</i> , 2008

2.8 UTILIZZO DEL TILLING PER IL MIGLIORAMENTO GENETICO

Nonostante la strategia TILLING sia stata inizialmente concepita come strumento per analisi di genomica funzionale, recentemente sono state sviluppate popolazioni TILLING anche in specie di elevato interesse agronomico con l'obiettivo di migliorarne le performance produttive. Un importante risultato applicativo è stato conseguito nel progetto TILLING in frumento da parte di Slade e collaboratori (2005). Presso i laboratori dell' "Anawah Inc." sono state realizzate due piattaforme TILLING: una in frumento tenero esaploide ed una in frumento duro tetraploide. E' stato scelto da

sottoporre all'analisi molecolare il gene *Granule Bound Starch Synthase I (GBSSI)*, meglio noto come gene *waxy*, responsabile della biosintesi di amilosio nei granuli di amido della cariosside. Si suppone che la perdita di tutte le copie omeologhe del gene *GBSSI* determini la produzione nella cariosside di granuli di amido a basso contenuto di amilosio caratterizzati da proprietà fisico-chimiche uniche. Nonostante svariati tentativi con approcci di miglioramento genetico tradizionale, non è stato possibile introdurre questo carattere in varietà di frumento di elevata importanza commerciale. Utilizzando un approccio TILLING, Slade e collaboratori hanno identificato mutazioni che inattivano la funzione in tutti i tre geni *GBSSI* omeologhi di frumento tenero e, mediante un accurato programma di incrocio, hanno creato una linea tripla mutante. L'analisi fenotipica delle cariossidi del triplo mutante ha messo in evidenza la presenza di granuli con basso livello di amilosio (Slade *et al.*, 2005).

Le strategie TILLING ed Ecotilling sono state utilizzate anche per la produzione di linee mutanti resistenti nei confronti di agenti patogeni (mutanti "loss-of-susceptibility"). I fattori di trascrizione *eIF4E* ed *eIF(iso)4E* sono proteine vegetali utilizzate da alcuni virus patogeni per la replicazione del loro DNA (Diaz-Pendon *et al.*, 2004). Recentemente, è stato condotto uno esperimento Ecotilling su una collezione di accessioni di melone al fine di identificare nuove varianti alleliche del gene *eIF4E*. E' stata identificata con questa strategia una accessione di melone resistente al Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) (Nieto *et al.*, 2007).

3. L'ORZO

3.1 DOMESTICAZIONE DELLA SPECIE

Inizialmente Etiopia e Tibet (Aberg, 1938) vennero proposti come centri di origine dell'orzo coltivato; infatti resti di granella di *Hordeum vulgare* furono rinvenuti in siti archeologici della Mezzaluna Fertile (Mesopotamia), ad indicare che circa diecimila anni fa la coltura fu domesticata in quelle zone partendo dal progenitore selvatico *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*. Altri autori, alla luce di eventi di introgressione tra *H. vulgare* subsp. *spontaneum* ed orzo coltivato osservati in Siria e Marocco, suggerirono che probabilmente la domesticazione fosse avvenuta in più luoghi differenti (Molina-Cano, 1999).

Studi condotti da Badr e collaboratori (2000) hanno suggerito che la precisa zona geografica della Mezzaluna Fertile, che rappresenta uno dei possibili siti di domesticazione dell'orzo, è situata nell'area attualmente occupata da Israele e Giordania. Analizzando mediante marcatori molecolari le distanze genetiche tra il pool genico delle varietà coltivate e sei popolazioni differientemente localizzate all'interno della Mezzaluna Fertile, si è osservato che le accessioni selvatiche più strettamente correlate all'*Hordeum vulgare* sono quelle derivanti da Israele e dalla Giordania e che tale correlazione diminuisce dirigendosi dalle regioni meridionali a quelle più settentrionali della Mezzaluna Fertile. Sembra inoltre che anche popolazioni di orzo selvatico presenti nelle aree più occidentali dell'Iran abbiano contribuito al germoplasma delle varietà coltivate, passando attraverso un processo di diversificazione avvenuto nella regione dell'Himalaya che è stato proposto come centro di diversificazione nel processo di domesticazione dell'orzo (Badr *et al.*, 2000).

3.2 BOTANICA E TASSONOMIA

L'orzo appartiene alla famiglia delle *Poaceae*, alla Tribù delle *Triticee* ed al Genere *Hordeum*. La specie coltivata è *Hordeum vulgare* L. a cui appartengono differenti tipologie, distinte in base al numero di file di cariossidi nella spiga:

- Se le tre spighe presenti su ogni nodo del rachide della spiga sono tutte fertili si hanno orzi polistici di cui ne esistono due possibili forme: *H. vulgare exastichon inaequale* o tetrastico (a sei ranghi di cariossidi di cui quattro riuniti a due coppie nella spiga) e *H. vulgare exastichon aequale* o esastico (a sei ranghi equidistanti di cariossidi).
- Se solo la spigetta centrale di ogni nodo del rachide è fertile e le due laterali sono sterili si hanno orzi distici (*H. vulgare distichon*).

3.3 MIGLIORAMENTO GENETICO

L'orzo si presta particolarmente bene per studi fisiologici e genetici, tanto che i primi esperimenti sull'utilizzo dei marcatori molecolari in programmi di selezione assistita furono effettuati proprio in questa specie (Powell *et al.*, 1996; Toojinda *et al.*, 1998). Infatti, rispetto ad altri cereali, l'orzo ha un corredo cromosomico abbastanza semplice essendo una specie diploide ($2n = 14$), con cromosomi di grandi dimensioni che risultano adatti a studi di citogenetica. Presenta anche altri aspetti vantaggiosi, come il fatto di essere una specie autogama, annuale, e dotata di un'apprezzabile variabilità genetica. L'orzo è stato ampiamente analizzato mediante marcatori molecolari il che ha reso possibile la realizzazione di diverse mappe genetiche (Castiglioni *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1995). Inoltre, l'elevata sintonia tra il suo genoma e quello di altri membri delle *Triticeae*, rende in parte applicabili anche a questi ultimi i risultati di studi ottenuti in orzo (Singh *et al.*, 2006).

Il miglioramento genetico delle piante autogame, ed in modo particolare dell'orzo, è stato realizzato fino ai primi decenni del secolo scorso attraverso interventi di selezione massale, ovvero per linea pura da popolazioni locali o introdotte. In seguito si è invece preferito ottenere linee pure per successive generazioni di autofecondazione, partendo da ibridi intraspecifici ed applicando diverse modalità di selezione, come il metodo genealogico (o pedigree), per popolazione riunita o per discendenza da singolo seme (SSD). Nel tentativo di ampliare la base genetica delle popolazioni in esame negli ultimi decenni si stanno sempre di più applicando, anche nelle specie autogame, delle procedure di selezione ricorrente propriamente detta, analoghe a quelle ampiamente adottate per le piante a fecondazione allogama. Tali procedure risultano costituite da fasi di selezione e fasi di incrocio tra genotipi superiori allo scopo di ricostituire una popolazione migliorata; ciò può essere facilitato ricorrendo all'impiego della maschiosterilità (Conti *et al.*, 1997).

Attualmente i principali obiettivi del miglioramento genetico in orzo riguardano i seguenti caratteri: data di fioritura, resa, qualità della granella, resistenza all'allettamento, resistenza alle fitopatie e agli stress abiotici. Il miglioramento per questi caratteri viene oggi perseguito con maggiore facilità grazie all'utilizzo dei marcatori molecolari. Ad esempio, nel caso di incrocio tra orzo coltivato ed una specie selvatica, ricorrendo al reincrocio assistito con marcatori molecolari, è possibile recuperare rapidamente buona parte del patrimonio genetico del genotipo coltivato, eliminando con maggiore facilità i geni dei parentali selvatici che conferiscono caratteristiche svantaggiose come un'eccessiva altezza, un'eccessiva suscettibilità a malattie quali l'oidio, le ruggini, le virosi, la presenza di dormienza e la rottura della spiga. Il processo di domesticazione e miglioramento, che ha portato alla realizzazione delle moderne cultivar, ha però determinato una progressiva riduzione della base genetica di molte colture, tra cui anche l'orzo (Powell *et al.*, 1997). Attualmente, quindi, le principali fonti in cui ricercare la variabilità genetica necessaria per un programma di miglioramento sono le specie selvatiche e le popolazioni locali (mescolanze di linee pure) che fino al diciannovesimo secolo hanno rappresentato le uniche forme di coltivazione, sostituite poi dalle linee pure; (Nevo, 1992; Ceccarelli *et*

al., 1995). Al fine di conservare fonti importanti di variazione genetica e di fornire materiale da utilizzare nei lavori di miglioramento genetico, sono state costituite ampie collezioni di germoplasma sia coltivato che selvatico. Infatti, il genere *Hordeum* comprende 32 specie di cui la più famosa è quella coltivata (*Hordeum vulgare*). Le altre specie di *Hordeum* non sono state domesticate ma sono potenziali fonti di variazione genetica da utilizzarsi nel miglioramento genetico. Da ricordare l'*Hordeum bulbosum* che è stato ampiamente utilizzato per l'ottenimento di aploidi raddoppiati (Ho e Kasha., 1975).

3.4 IMPIEGO ED IMPORTANZA

L'orzo è il quarto cereale per importanza commerciale dopo frumento, riso e mais, e viene coltivato in un ampio numero di ambienti e territori diversi più di ogni altro cereale (a partire da una latitudine di 70° Nord in Norvegia fino a 46° Sud in Cile). Viene coltivato anche ad altitudini maggiori rispetto a tutti gli altri cereali come in Tibet, Etiopia e nelle Ande. L'orzo è inoltre considerato una coltura resistente alla siccità e in alcune aree del nord Africa, Asia, Afghanistan, Pakistan, e altri paesi, spesso è l'unica coltura possibile. L'area coltivata ad orzo è aumentata da 59 milioni di ettari nei primi anni sessanta, fino a oltre 80 milioni di ettari fra il 1976 e il 1980 per poi calare fino al 2007. Oggigiorno, l'orzo viene coltivato su 57 milioni di ettari (Fao Statistic Division, 2009). Nonostante il forte abbassamento dell'area coltivata, grazie agli avanzamenti tecnologici nella pratica colturale ed alla disponibilità di cultivar migliorate, la produzione mondiale di orzo è diminuita meno drasticamente assestandosi attorno a 140 milioni di tonnellate. Il mercato mondiale si sta sempre più orientando verso prodotti con migliori caratteristiche sia qualitative che quantitative come granella grossa e pesi ettolitrici elevati.

L'Europa è attualmente il maggiore produttore mondiale di orzo con 41 milioni di tonnellate/anno, seguita dai paesi dell'ex Unione Sovietica con 25 milioni di tonnellate e dal nord America con 17 milioni di tonnellate. Il principale esportatore mondiale è l'Europa con 12 milioni di tonnellate segue l'Australia con 3 milioni di tonnellate (Fao

Statistic Division, 2009). L' Italia fornisce una produzione di circa 1,2 milioni di tonnellate, pressoché totalmente destinata all'alimentazione zootecnica; risulta infatti marginale la produzione nel nostro paese di orzo da birra. In ogni caso la produzione nazionale d'orzo zootecnico è insufficiente a coprire i fabbisogni interni e l'importazione interessa oltre 600.000 tonnellate di prodotto. L'orzo viene utilizzato per l'alimentazione degli animali, allo stadio vegetativo (pascoli verdi), o può essere raccolto prima della maturità ed essere insilato.

La granella può essere utilizzata anche come alimento per l'uomo mediante la produzione di farine destinate alla panificazione, oppure, opportunamente trattata, può essere utilizzata come ingrediente per pietanze a base di cereali. L'orzo può essere utilizzato anche per la produzione di bevande succedanee del caffè o del cioccolato, previa tostatura, macinazione e liofilizzazione. La paglia viene utilizzata come lettiera per animali, nell'alimentazione animale e come materiale di copertura per i tetti delle capanne in alcuni paesi dell'Asia e Africa. Nel settore dell'industria delle bevande alcoliche è invece impiegato, previa trasformazione in malto, come materia prima per la produzione della birra e, nella distilleria, per la produzione liquori ad alta gradazione alcolica.

3.5 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE

Di seguito sono descritte brevemente le principali caratteristiche morfologiche dell'orzo e, per ogni settore della pianta, sono riportati alcuni esempi di mutanti morfologici identificati. Infatti, la mutagenesi sperimentale è stata ampiamente utilizzata in orzo sia per studi di genetica classica (al fine di determinare il controllo genetico di un carattere e la sua trasmissibilità) sia per ottenere cultivar con caratteristiche superiori.

FUSTO. Il culmo dell'orzo è cilindrico ed è formato, al termine della fase di levata, da una serie di internodi cavi (in numero compreso tra 5 ed 8) separati da setti trasversali pieni detti "nodi". Il numero e la lunghezza degli internodi sono fortemente influenzati sia da fattori ambientali che genetici: ad esempio, il mutante *multinodosum*

arriva anche a 30-40 internodi molto ravvicinati tra loro (Svalöv collection, Sweden). La lunghezza del culmo può variare da 15 cm in alcune forme selvatiche fino a 150 cm in particolari cultivar. Per ogni pianta si formano quasi sempre più culmi, uno principale e due o tre di accestimento anche se, in semina distanziata, alcuni genotipi possono produrre fino a 60 culmi fertili. All'opposto, esistono mutanti denominati *intermedium* caratterizzati da basso numero di culmi di accestimento (Svalöv collection, Sweden) e mutanti *uniculmo* in cui manca completamente la capacità di accestire (Barley Genetic Stock Center; BGS, Colorado). Il portamento delle giovani piantine può essere diverso: più o meno prostrato oppure semieretto o eretto. Nonostante l'altezza e il portamento siano caratteri notoriamente influenzati da numerosi geni, sono stati identificati mutanti a controllo monogenico che hanno consentito di dimostrare l'esistenza di geni con forte effetto sul fenotipo. I mutanti per il portamento *brachytic*, *brachytic dwarf* e *slender dwarf* (Barley Genetic Stock Center, Colorado) sono solo alcuni esempi tra gli innumerevoli identificati e descritti.

FOGLIE. Le foglie, di forma lanceolata, sono disposte in modo alterno sul fusto e sono costituite da una guaina (che avvolge il fusto) ed una lamina sporgente. Le foglie di orzo si differenziano da quelle di altri cereali microtermi per la presenza di auricole molto allungate e dalla ligula poco appariscente; esistono comunque anche mutanti *liguleless* completamente privi di ligule (Svalöv collection, Sweden). La lamina fogliare è liscia nella pagina inferiore, mentre presenta delle scanalature in quella superiore in cui sono presenti cellule epidermiche igroscopiche. La lunghezza, la larghezza, la forma della foglia e soprattutto l'angolo di inserzione della lamina fogliare sul fusto sono caratteri geneticamente determinati che vengono comunemente utilizzati per la distinzione varietale. La foglia terminale (bandiera) è la più piccola e la sua guaina, avvolgendo la spiga subito prima della sua emergenza, determina un tipico ingrossamento (fase di botticella).

INFIORESCENZA. L'infiorescenza dell'orzo è una spiga caratterizzata da un breve rachide a zig-zag costituito da 20-30 nodi su ognuno dei quali, in posizione alterna, sono portate tre spiglette uniflore, una mediana e due laterali. Le numerose forme di orzo coltivate vengono distinte in base al numero di file di cariossidi della spiga. Se

solo la spighetta centrale di ogni nodo del rachide è fertile e le due laterali sono sterili, la spiga porta due soli ranghi ed ha una forma fortemente appiattita: sono questi gli orzi distici (*Hordeum vulgare distichon*). Se le tre spighette presenti su ogni nodo del rachide sono tutte fertili, si hanno gli orzi polistici (o esastici) (*Hordeum vulgare exastichon*), a sei file. Questi a loro volta, possono essere distinti ulteriormente come segue:

- Cariossidi disposte a raggiera regolare: orzi esastici (*H. vulgare exastichon aequale*)
- Cariossidi laterali molto divaricate e quasi sovrapposte a quelle soprastanti e sottostanti così da apparire di 4 file e quadrangolare in sezione: orzi impropriamente detti tetrastici (*H. vulgare exastichon inaequale*).

Ogni spighetta porta ai lati due glume sterili che, a differenza del frumento, sono molto ridotte e possono risultare simili a formazioni pelose. Ogni fiore presenta due brattee: una glumetta inferiore (lemma) con funzione protettiva ed una glumetta superiore denominata palea. In genere la lemma presenta una nervatura mediana molto pronunciata che termina, spesso, in una lunga appendice sporgente chiamata resta o arista. La palea è avvolta dalla lemma in quanto più piccola rispetto a quest'ultima ed entrambe a maturazione aderiscono alla cariosside (frutto vestito), ad eccezione delle varietà a cariosside nuda. Il fiore, ermafrodita, è formato da un androceo con tre stami e un carpello portante nella parte terminale due stimmi pelosi. Il frutto è una cariosside di colore tendente al giallo (esistono anche varianti a cariosside bianca o addirittura rossastra o nera) nella quale il seme vero è strettamente saldato con il pericarpo. Il tipico solco ventrale del frutto è più o meno marcato in funzione della varietà e l'appendice apicale (rachilla) si presenta più o meno pelosa. Nella varietà distiche le cariossidi hanno dimensioni maggiori nella parte centrale della spiga, rispetto a quelli basali o terminali mentre nei genotipi polistici, un terzo delle cariossidi, ovvero quelle delle due file centrali, sono tra loro simmetriche, mentre quelle delle file laterali possiedono un peso inferiore.

L'ampio utilizzo di svariate tecniche di mutagenesi in questa specie, ha permesso di evincere molti degli aspetti genetici legati allo sviluppo e alla morfologia della spiga. In effetti, sono stati identificati un numero molto elevato di mutanti di orzo con alterazioni o deficienze a livello dell'infiorescenza, il che ha rivelato la presenza di una notevole complessità genetica alla base della formazione degli organi fiorali. I mutanti esibiscono variazioni nelle dimensioni, colore, compattezza, orientamento della spiga ed ancora assenza di singoli organi o sostituzioni con organi differenti (mutanti omeotici). In tabella sono elencati alcuni dei principali mutanti della spiga appartenenti alla collezione della Nordic Genebank: una delle collezioni di mutanti di orzo più ricche e meglio descritte (<http://www.nordgen.org/ngb/>; Lundqvist, 2005).

MUTANTE	FENOTIPO/SECONDO NOME	NOME LOCUS
Irregular Spike	Deformed spike	def
	Branched spike	bcr
	Irregular row number	vrs
Breviaristatum	Short awns	ari, lks, sca
Laxatum	Lax spike	lax
Compositum	Branched spike	com
Hexasticon	Six-row spike	vrs1
Macrolepis	Elongated outer glumes	eog
Erectoides	Dense spike	ert, dsp
Pyramidatum	Pyramid shake spike	pyr
Zeocriton	Dominant compact spike	zeo
Extra floret	Extra central spiklet	flo
Calcaroides	Subjacent hood	cal, sbk
Braceteatum	Third outer glumes	bra, trd
Double seed	Double kernel	dub
Curly awns	Twisted awns	caw
Wilting awns	Weak awns	waw
	Dehiscent awns	daw

Long awns	Long awns	law
Long shaped grains	Long kernels	lgk
Short spike	Lesser rachis internode number	lin
Dark grains	Brown kernels	brk
Smooth awns	Smooth awns	raw
Eburatum	Albino lemma	ebu
Long spike	More kernels	
Brittle spike	Fragile rachis	btr, fst
Robiginosum	Orange lemma	rob
Viviparoides	Delayed spike development	viv
Upper half spike sterile	Tip sterile	tst
Narrow spike	Thin kernel	gra
Elongated glumes	Elongated outer glumes	eog
Triaristatum	Triple awned lemma	trp
Yellow awns	Yellow awns	yaw
Scirpoides	Sciroides spike	sci
Opposite spikelets	Variable rachis internode length	ops
Hanging spike	Nodding spike	

RADICI. In fase di germinazione si sviluppano le radici seminali o primarie che si allungano fino a formare una massa di radici ramificate fibrose alcune delle quali si estendono anche in profondità. Successivamente, con la fase di accostamento, inizia la formazione anche del sistema radicale secondario (radici avventizie) dalla base della corona. A volte può verificarsi che, in conseguenza di condizioni di scarsa disponibilità idrica o di altre cause ambientali, le radici avventizie o secondarie non si sviluppino ed in questo caso la pianta può raggiungere la maturità con le sole radici seminali. In situazioni normali queste cessano la loro funzione assorbente precocemente. Tutti i tipi di radici descritti sono in grado di formare radici laterali e peli radicali (di primaria importanza per l'assorbimento di acqua e nutrienti). In terreni molto profondi le radici

possono arrivare anche a due metri di profondità (le più profonde sono in genere di origine seminale). La massima estensione dell'apparato radicale si riscontra all'antesi.

3.6 IMPORTANZA ED ANALISI DELL'APPARATO RADICALE DI ORZO

Le radici di orzo, e delle piante in generale, svolgono due funzioni principali: l'assorbimento di acqua e nutrienti e l'ancoraggio della pianta al suolo. Il corretto sviluppo dell'apparato radicale è un requisito di primaria importanza per la realizzazione di queste richieste funzionali e, quindi, per la sopravvivenza e il raggiungimento di un buon rendimento produttivo (Hochholdinger *et al.*, 2004).

3.6.1 MUTANTI DELLA RADICE E LORO UTILIZZO

I primi studi genetici circa l'architettura e l'accrescimento dell'apparato radicale delle monocotiledoni sono stati compiuti in *Zea mays* e *Oryza sativa* grazie alla possibilità di avvalersi di mutanti specifici della radice. In tabella sono riportati solo alcuni esempi:

MUTANTE	SPECIE	FENOTIPO	REF.
Radici Avventizie			
rtcs	<i>Zea mays</i>	Mancanza di radici avventizie	Hetz <i>et al.</i> , 1996
rt1	<i>Zea mays</i>	Poche radici avventizie	Jenkins <i>et al.</i> , 1930
cr11	<i>Oryza sativa</i>	Poche radici avventizie	Inukai <i>et al.</i> , 2001a
cr12	<i>Oryza sativa</i>	Poche radici avventizie	Inukai <i>et al.</i> , 2001b
Radici laterali			
lrt1	<i>Zea mays</i>	Nessuna radice laterale	Hochholdinger <i>et al.</i> , 1998
slr1	<i>Zea mays</i>	Limitato allungamento delle radici laterali	Hochholdinger <i>et al.</i> , 2001
slr2	<i>Zea mays</i>	Limitato allungamento delle radici laterali	Hochholdinger <i>et al.</i> , 2001
rm109	<i>Oryza sativa</i>	Bloccato allungamento delle radici laterali	Hao <i>et al.</i> , 1999
Radice primaria			
rm1	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Ichii e Ishikawa, 1997

rm2	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Ichii e Ishikawa, 1997
rrl1	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Inukai <i>et al.</i> , 2001b
rrl2	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Inukai <i>et al.</i> , 2001b
srt5	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Yao <i>et al.</i> , 2002
srt6	<i>Oryza sativa</i>	Allungamento della radice primaria ridotto	Yao <i>et al.</i> , 2003
Peli radicali			
rth1	<i>Zea mays</i>	Ridotto allungamento dei peli radicali	Wen e Schnable, 1994
rth2	<i>Zea mays</i>	Ridotto allungamento dei peli radicali	Wen e Schnable, 1994
rth3	<i>Zea mays</i>	Ridotto allungamento dei peli radicali	Wen e Schnable, 1994
rh2	<i>Oryza sativa</i>	Assenza di peli radicali	Ichii, 2000

Sono invece pochissime le informazioni genetiche relative alla morfologia e all'accrescimento della radice dei cereali autunno-vernini. Questa lacuna è in parte dovuta alla complessità genomica di frumento duro e tenero, in assoluto le due specie di maggiore interesse economico appartenenti alla tribù delle *Triticee*. In effetti, l'identificazione di varianti fenotipiche in specie con genoma poliploide è talmente difficoltosa da scoraggiare gli studiosi ad intraprendere studi di dissezione genetica della morfologia radicale in queste due specie. Al momento, sono disponibili solo poche e frammentarie informazioni per specie considerate “modello” dei frumenti; queste specie (ad esempio l'orzo) sono filogeneticamente molto simili ma con genoma molto più semplice. In seguito si riportano alcuni esempi di analisi dei mutanti radicali di orzo:

- L'analisi di una collezione di mutanti di orzo ha permesso l'identificazione del mutante *agr (agravitropic)*, con crescita radicale agravitropica e germoglio con crescita normale (Tagliani *et al.*, 1986).
- Recentemente presso l'Università di Silesia è stata effettuata l'analisi di una collezione di mutanti di orzo al fine di identificare varianti per la lunghezza delle radici. L'indagine ha permesso di individuare alcuni mutanti per la lunghezza delle radici seminali (Nawrot *et al.*, 2005).
- Lo stesso materiale è stato allevato in condizioni di crescita aeroponica per l'identificazione di mutanti con deficienze nello sviluppo dei peli radicali

(Szarejko *et al.*, 2005). Sono state individuate 17 mutazioni indipendenti. I mutanti individuati sono stati raggruppati in quattro differenti categorie: privi di peli radicali (*roothair less; rhl*), sviluppo del pelo radicale bloccato nelle prime fasi di crescita (*roothair primordia; rhp*), peli radicali corti (*roothair short; rhs*) e peli irregolari (*roothair irregular; rhi*). Analisi genetiche preliminari hanno permesso di stabilire che ognuna delle mutazioni individuate è sotto controllo di un singolo gene recessivo (Szarejko *et al.*, 2005). La caratterizzazione molecolare di uno dei mutanti *rhl* ha consentito inoltre il mappaggio ed il clonaggio del gene *HvEXPβ1* responsabile della mutazione (Kwasniewski e Szarejko, 2006).

L'analisi di mutanti radicali risulta di grande interesse per identificare nuove sequenze geniche coinvolte nella determinazione dell'architettura radicale, stabilire il loro ruolo nell'assorbimento ed in ultimo investigare il loro effetto sulla produzione della pianta (deDorlodot *et al.*, 2007).

L'indagine degli aspetti morfo-fisiologici della radice è resa particolarmente ardua per la mancanza di protocolli e strumenti idonei per l'analisi di un apparato della pianta non visibile e che interagisce direttamente con il suolo. È infatti praticamente impossibile visualizzare correttamente la radice durante il suo sviluppo in condizioni naturali di crescita ed inoltre quasi tutte le tecniche analitiche causano inevitabilmente la morte della pianta. Particolarmente complessa è l'analisi disgiunta dei singoli componenti della radice (peli radicali, radici avventizie, ecc.) ed individuare il loro preciso ruolo fisiologico. Disporre di una collezione di mutanti radicali potrebbe permettere di definire l'effetto della perdita di una funzione, come l'assenza di peli radicali o l'alterazione dei tropismi, su un meccanismo radicale. Ad esempio, un mutante *hairless* di orzo (*bald root barley; brb*) è stato recentemente utilizzato al fine di comprendere il preciso ruolo dei peli radicali di orzo nell'assorbimento del fosforo (Gahoonia *et al.*, 2001).

3.6.2 IDENTIFICAZIONE DI QUANTITATIVE TRAIT LOCUS (QTL) E UTILIZZO IN PROGRAMMI DI SELEZIONE ASSISTITA.

Intervenire modificando l'architettura della radice delle specie agrarie, ovvero alterando la distribuzione delle radici nel suolo, può consentire un migliore utilizzo delle risorse del suolo e quindi riflettersi in un incremento nella produzione (deDorlodot *et al.*, 2007). È stato recentemente constatato che buona parte della variabilità nella morfologia dell'apparato radicale è imputabile a fattori genetici; è quindi verosimile applicare comuni tecniche di genetica molecolare al fine di identificare marcatori strettamente associati a QTL coinvolti in aspetti morfo-fisiologici radicali ed utilizzare queste informazioni in programmi di miglioramento genetico (Selezione Assistita da Marcatori; MAS). La maggioranza degli studi, volti all'identificazione di QTL per la morfologia dell'apparato radicale sono stati condotti in *Oryza sativa* (Price e Tomos., 1997; Steele *et al.*, 2006) e *Zea mays* (Price *et al.*, 2002; Giuliani *et al.*, 2005). Alcune ricerche hanno riguardato anche altre specie agrarie: ad esempio sono stati individuati in *Phaseolus vulgaris* due QTL coinvolti nell'emissione di radici avventizie in condizioni di limitato contenuto di fosforo nel suolo (Ochoa *et al.*, 2006). Vi sono comunque ancora molti limiti tecnici nell'identificazione di nuovi QTL per l'apparato radicale: la maggioranza dei caratteri radicali sono a bassa ereditabilità, presentano forti interazioni tra genotipo ed ambiente e forte interazione fra geni (fenomeni di epistasi). In quest'ottica, l'analisi QTL può essere facilitata dall'utilizzo di mutanti con fenotipo radicale evidente e facilmente distinguibile dal fenotipo selvatico.

3.7 ESIGENZE AMBIENTALI E SOSTENIBILITA'

L'orzo ha una serie di caratteristiche peculiari che lo differenziano dal frumento e da altri cereali autunno-vernini e che gli conferiscono una maggiore adattabilità ad ambienti marginali molto diversi e lo rendono apprezzabile in un contesto di agricoltura sostenibile. Innanzitutto, l'orzo è più precoce del frumento ed il suo breve

ciclo biologico gli consente di essere coltivato fin quasi al circolo polare artico dove è l'unico cereale che, seminato dopo l'inverno, riesce a giungere a maturazione. L'orzo è altresì preferito al frumento dove la siccità è molto spinta, ciò grazie ai consumi idrici relativamente ridotti ed alla tolleranza alle alte temperature. Inoltre l'orzo, grazie alla sua precocità, riesce a maturare tanto presto da sfuggire meglio delle altre specie alla siccità e ad utilizzare al massimo, ai fini produttivi, la poca acqua disponibile. Per questo l'orzo è il cereale dominante nelle zone semiaride del Medio Oriente e del Nord Africa. Infatti, in ambienti dove l'acqua è un fattore limitante, è il cereale che dà maggiori garanzie di riuscita e supera in produttività non solo il frumento, ma anche l'avena e la segale. Per il settore agricolo, l'acqua rappresenta uno dei fattori determinanti per il risultato qualitativo e quantitativo delle produzioni agricole: molte delle colture attualmente realizzate risultano possibili esclusivamente con il supporto dell'irrigazione. Allo stesso tempo il livello di irrigazione deve risultare, in un contesto di agricoltura sostenibile, compatibile con le esigenze di salvaguardia del territorio e di tutela della risorse naturali. In effetti, l'acqua è oggi considerata uno degli elementi di primaria importanza nella crescita di un territorio sia in termini economici che sociali. In questo contesto l'orzo, in quanto coltura a basso consumo idrico, esercita un impatto piuttosto ridotto sul territorio in termini di prelievi idrici e può essere considerato compatibile con le richieste di agro-sostenibilità.

Per quanto riguarda il terreno, l'orzo produce meglio del frumento in terreni poveri e sabbiosi, purché ben drenati, ed è il cereale in assoluto più resistente alla salinità (fino a 8-10 mS/cm produce normalmente). Per questa regione l'orzo è il principale cereale coltivato nelle oasi dei deserti africani medio-orientali caratterizzati da alte concentrazioni di salinità dell'acqua e del terreno. E' preferibile che i terreni siano ricchi di fosforo e potassio mentre non devono essere molto dotati in azoto, perché l'abbondanza di questo elemento favorisce un'eccessiva produzione di paglia e facilita l'allettamento. Riassumendo, in generale l'orzo non richiede forti interventi di lavorazione del terreno e soprattutto di fertilizzazione. L'orzo può quindi essere considerata una coltura a basso impatto ambientale in quanto è assodato che i fertilizzanti possono contribuire all'inquinamento delle acque con ripercussioni più o

meno pesanti sull'ecosistema agricolo. Può essere altresì considerata una coltura sostenibile in un contesto di risparmio energetico/economico: il ridotto numero di interventi agronomici consente di ottenere una buona produzione con un basso dispendio di forze ed energie. Anche per questi motivi l'orzo è uno dei cereali maggiormente coltivati in paesi emergenti in cui non è concepibile un approccio di agricoltura intensiva.

II OBIETTIVI

Nell'ambito di un precedente progetto di ricerca, è stata realizzata presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie AgroAmbientali (DiSTA) dell'Università di Bologna una risorsa TILLING in orzo (*Hordeum vulgare*) della varietà Morex, ottenuta in seguito a mutagenesi chimica con azide sodica. È stata così creata una risorsa utile per studi di genomica funzionale in una specie di elevata importanza economica, che grazie al suo genoma relativamente semplice, è da sempre considerata un modello per tutte le *Triticeae*. La risorsa, denominata "TILLMore" (TILLING in Morex), attualmente include 4.906 famiglie mutanti in generazione M₄ (Talamè *et al.*, 2008).

L'attività della presente ricerca consiste nell'utilizzo della risorsa TILLMore sia per studi sia di genetica inversa, per geni coinvolti nello sviluppo radicale in orzo, che di genetica diretta, per l'identificazione di varianti morfologiche rispetto a Morex "wild-type". I singoli obiettivi possono essere così riassunti:

1) Analisi fenotipica della popolazione TILLMore per il riconoscimento di varianti morfo-fisiologiche per caratteri di interesse:

Un'analisi preliminare della popolazione in generazione M₂, condotta tramite confronto con Morex non trattato, ha evidenziato la presenza di una elevata quantità di varianti fenotipiche alcune delle quali interessanti anche dal punto di vista agronomico. Di conseguenza, la popolazione potrebbe essere una risorsa utilizzabile per studi di genetica diretta. È stata quindi condotta una valutazione fenotipica di tutta la popolazione TILLMore in generazione M₃ al fine di conseguire i seguenti obiettivi: stabilire il livello di ereditabilità dei fenotipi osservati ed effettuare valutazioni fenotipiche che saranno utili anche per la realizzazione di un database, accessibile on-line, il quale potrebbe risultare di interesse anche per altri gruppi di ricerca. La risorsa TILLMore è stata inoltre saggiata anche per l'individuazione di mutanti che presentano un apparato radicale fenotipicamente alterato rispetto a Morex non trattato.

2) Analisi di geni coinvolti nello sviluppo dell'apparato radicale tramite approccio TILLING:

Nel settore agricolo, sempre maggiore importanza rivestono gli aspetti legati all'efficienza di utilizzo dell'acqua ed in particolare al mantenimento di un adeguato livello di produzione delle colture anche in condizioni di limitati apporto idrici. Tra i diversi fattori che incidono sulla resistenza delle piante alla siccità, di primaria importanza sono le caratteristiche morfologiche dell'apparato radicale (Tuberosa e Salvi, 2006). Nonostante l'elevata importanza agronomica, un'analisi genetica sistematica dei meccanismi di sviluppo radicale nei cereali è iniziata solo negli ultimi anni e quasi esclusivamente in *Oryza sativa* e *Zea mays* (Wen *et al.*, 1994; Inukai *et al.*, 2001a; Inukai *et al.*, 2001b; Hochholdinger *et al.*, 2004). Poche informazioni sono invece disponibili per altre specie come ad esempio *Hordeum vulgare*. La risorsa TILLMore è stata quindi utilizzata per l'individuazione di mutanti in orzo per geni coinvolti nello sviluppo e nella funzionalità dell'apparato radicale. In un primo tempo sono stati individuati, tra i geni coinvolti nello sviluppo della radice, i più idonei per l'analisi TILLING. I criteri di scelta hanno limitato la selezione a geni con le seguenti caratteristiche: (i) geni aventi un ruolo nella determinazione della morfologia radicale; (ii) quando possibile geni "single copy"; (iii) con disponibilità di informazioni sulla struttura del gene (i.e. informazioni sulla posizione dei principali domini funzionali e sulla localizzazione di introni/esoni). In un secondo tempo, per i geni selezionati di cui non si dispone della sequenza genomica di orzo, sono state effettuate analisi bioinformatiche, eventualmente seguite da amplificazioni PCR e sequenziamento degli amplificati, finalizzate all'ottenimento di informazioni su cDNA e cloni genomici dei geni selezionati. Infine, si è proseguito con l'analisi molecolare TILLING della popolazione con l'obiettivo di identificazione di varianti alleliche indotte dal trattamento mutageno.

III MATERIALI E METODI

1. LA RISORSA TILLMore

La risorsa TILLMore, utilizzata per lo svolgimento di questa tesi, è rappresentata da una popolazione di orzo (*Hordeum vulgare* cv. Morex) ottenuta in seguito a mutagenesi chimica. La popolazione è stata realizzata nell'ambito di un precedente progetto di ricerca finalizzato allo sviluppo e all'utilizzo di una risorsa TILLING in orzo per l'identificazione di varianti alleliche in geni d'interesse (Talamè *et al.*, 2008). La scelta di Morex, varietà esastica e primaverile a maturazione precoce, come background della popolazione mutagenizzata è stata effettuata in quanto tale varietà, oltre ad essere ampiamente utilizzata negli Stati Uniti a scopo commerciale (principalmente per la produzione di malto da birra), risulta essere una delle più utilizzate per lo sviluppo di mappe genetiche in orzo ed è quindi già ben caratterizzata dal punto di vista molecolare. La varietà Morex rappresenta quindi uno dei migliori candidati per il futuro sequenziamento dell'intero genoma di orzo. Sebbene l'ottenimento della popolazione mutagenizzata sia stato condotto prima dell'inizio della ricerca presentata in questa tesi, per fornire un quadro completo delle attività svolte verrà descritta brevemente la metodica seguita. Il trattamento mutageno è stato effettuato su seme di Morex gentilmente fornito dal Dr. Schiefelbein dell'Università del Minnesota utilizzando diverse concentrazioni di azide sodica (NaN_3). Tre gruppi di 20.000 semi ciascuno sono stati trattati con tre diverse dosi di NaN_3 (1, 5 e 10 mM) seguendo il protocollo descritto da Nilan *et al.*, (1973) e poi seminati presso l'azienda sperimentale della facoltà di Agraria a Cadriano (BO). Da osservazioni effettuate sulla popolazione M_1 relativamente ad allungamento del coleoptile, frequenza delle chimere settoriali e fertilità della spiga, il trattamento condotto con la concentrazione più elevata di agente mutageno (10mM) è risultato il più efficace in termini di frequenza di mutazioni indotte senza tuttavia ridurre drasticamente la fertilità della spiga; si è proceduto quindi alle successive generazioni utilizzando la popolazione M_1 originatasi da questo trattamento. Sono state allevate in campo ca. 7.200 piante M_2 della quali solo 5.600 hanno raggiunto la maturazione e sono state numerate (cartellinatura manuale) in modo

che ogni pianta mutante, e quindi anche la sua discendenza, fosse identificata da uno specifico codice numerico. Osservazioni effettuate sulla popolazione mutagenizzata hanno evidenziato che ca. il 13% delle piante M_2 manifestava un fenotipo alterato; le varianti fenotipiche sono state quindi classificate sulla base delle mutazioni morfologiche osservate. In seguito a maturazione, le spighe raccolte da ciascuna delle piante M_2 sono state opportunamente sgranate, catalogate e conservate.

2. ALLEVAMENTO ED ANALISI FENOTIPICA DELLE FAMIGLIE M_3

Ca. 4.900 famiglie M_3 , ciascuna proveniente da una singola pianta M_2 ed ottenute per sgranatura manuale, sono state seminate “a postarella” su 60 colonne ed 83 file (le postarelle sono state organizzate in quattro campi di 15 colonne ciascuno). Per ogni postarella sono state seminati ca. 20 semi M_3 . Per avere un confronto fenotipico valido, sono state allevate ad intervalli regolari delle postarelle di Morex “wild-type” (ogni nove file, nelle colonne no. 5 ed 11 di ognuno dei quattro campi) al fine di facilitare la valutazione fenotipica e di limitare errori di valutazione dovuti all’eventuale presenza di un gradiente ambientale.

La popolazione M_3 è stata analizzata in diverse fasi fenologiche per consentire l’identificazione di varianti fenotipiche evidenti rispetto a Morex “wild-type”. Tutte le varianti identificate sono state raggruppate nelle seguenti categorie morfologiche: morfologia della pianta, colore, altezza, livello di accestimento, habitus, presenza di necrosi fogliari, aspetto della foglia, cerosità della pianta, data di spigatura e morfologia della spiga. Le indagini morfologiche sono state effettuate con l’aiuto della Dott.ssa Udda Lundqvist, una delle maggiori esperte del settore (mutanti in orzo), che attualmente collabora con il Dipartimento di Genetica vegetale dell’Università di Lund (Svezia).

3. CAMPIONAMENTO ED ESTRAZIONE DEL DNA

Il campionamento fogliare è stato effettuato sulle famiglie M₃ allo stadio di tardo accostamento prelevando porzioni di circa 2 cm della parte mediana di cinque foglie appartenenti a cinque piante differenti della stessa famiglia e ponendole in singoli tubi organizzati in piastre da 96 (Cluster tubes Simport). Sono state ottenute in totale 51 piastre per le quali la posizione dei singoli campioni è stata registrata ed identificata in maniera univoca. Tutti i campioni sono stati immediatamente liofilizzati e conservati in contenitori sigillati in presenza di gel di silice per limitarne la reidratazione.

Il DNA genomico di tutti i 4.906 campioni fogliari è stato estratto direttamente in formato piastra da 96 pozzetti in modo automatizzato utilizzando il robot TECAN Freedom EVO 150 ed il kit Wizard® Magnetic 96 DNA Plant System (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A). E' stato seguito il protocollo di estrazione fornito dalla ditta produttrice apportando solo piccole modifiche nelle fasi di omogeneizzazione e di lisi del campione. In particolare, l'omogeneizzazione è stata effettuata a secco utilizzando un Mixer-Mill (Retsch MM300; Qiagen GmbH, Hilden, Germania) in piastra da 96 microtubi (Cluster tubes; Simport Plastic Ltd., Beloeil, QC, Canada) partendo da foglie liofilizzate (20-30 mg in peso secco) ed utilizzando biglie in acciaio Inox del diametro di 4 mm. L'omogeneizzazione è stata condotta in due tempi, di 3 minuti ciascuno, alla massima velocità (30 agitazioni/secondo). Per la lisi del campione, il tessuto fogliare macinato è stato miscelato con 250 µl di Lysis Buffer A fornito dal kit, con incubazione a 50°C per 30 minuti in leggera agitazione. La qualità e l'omogeneità del DNA estratto da ogni piastra da 96 campioni è stata controllata su un gel di agarosio allo 0,8% (SeaKem LE Agarose-Cambrex) in tampone TBE 0,5X (1X TBE: 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8) e la quantità di DNA estratto è stata determinata attraverso una lettura spettrofotometrica, utilizzando lo strumento di lettura GENios integrato nella *workstation* TECAN Freedom EVO 150. La concentrazione media, ottenuta con il protocollo in questione, è stata di 10 ng/µl.

4. PREPARAZIONE DEL DNA TRAMITE DILUIZIONE E POOLING

Tutti i campioni di DNA organizzati in piastre da 96 pozzetti sono stati posti a –80 °C per la realizzazione di una “DNA library” (piastre stock). Per ogni campione, parte della soluzione di DNA (10 µl) è stata trasferita in piastre da 96 campioni (Unithermal PP Cycle Plates, Delchimica) ed utilizzata per una diluizione in TE 0,1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA pH 8) portando i campioni ad una concentrazione di utilizzo 20 volte inferiore (piastre di diluizione). Le piastre di diluizione sono conservate a –80 °C fino al momento dell’uso. Sono state ottenute in totale 51 piastre stock e 51 piastre di diluizione. I campioni di DNA genomico diluiti sono stati raggruppati seguendo uno schema di “pooling a due dimensioni”. Sono stati creati due gruppi di piastre pool: il primo unendo tutti i campioni di ogni singola colonna delle piastre di diluizione (pooling da 8 campioni), il secondo raggruppando tutti i campioni di ogni riga delle piastre (pooling da 12 campioni). Ogni singolo campione di DNA è quindi presente in entrambi i set di piastre bulk, miscelato con campioni differenti. In totale sono state create sei piastre di “pooling da 8” e quattro piastre di “pooling da 12”. Tutte le piastre di pooling sono conservate a –20 °C fino al momento dell’utilizzo.

5. ASPETTI MOLECOLARI DELLA PROCEDURA TILLING

Una parte delle analisi molecolari e la messa a punto del protocollo TILLING basato su taglio molecolare con l’enzima *CelI* e visualizzazione dei frammenti con sequenziatore ABI3730 è stato condotto presso le strutture della “Piattaforma Genomica” del Parco Tecnologico Padano (PTP) di Lodi (<http://www.tecnoparco.org/>).

5.1 SELEZIONE DEI GENI E PROGETTAZIONE DEI PRIMER

Sono stati scelti per essere sottoposti all’analisi molecolare, geni di *Hordeum vulgare* coinvolti nell’accrescimento e nella morfologia dell’apparato radicale. Per quasi tutti i geni considerati la sequenza genomica di orzo non era nota, per cui la progettazione dei

primer per l'analisi PCR è stata preceduta da analisi bioinformatiche volte ad individuare l'identità di sequenze espresse (EST) di orzo con la sequenza genomica di *Oryza sativa* o di *Arabidopsis thaliana*. La progettazione dei primer è poi avvenuta basandosi sulle alle informazioni di sequenze EST di orzo. I geni considerati sono:

-HvBRX1 (*Brevis Radix 1*): è un gene chiave per il corretto accrescimento della radice primaria e delle radici laterali. Il gene è stato identificato sia in *Arabidopsis thaliana* (AY702649; *AtBRX*) che in *Oryza sativa* (Os08g36020; *OsBRX1*) (Briggs *et al.*, 2006; Mouchel *et al.*, 2004). In entrambe le specie, il gene *BRX1* è un membro di una famiglia di 5 elementi molto simili tra loro (Briggs *et al.*, 2006). Per la ricerca di sequenze EST di orzo è stata utilizzata la funzione “tblastx” (Search translated nucleotide using a translated nucleotide query) del programma BLAST del “National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizzando come “query” la sequenza trascritta di riso. Sono state identificate due sequenze EST di orzo (BG366557 e BQ464470; Close *et al.*, 2001) che presentano elevata omologia con il gene *OsBRX1*. La progettazione dei primer è stata effettuata su una sequenza di 680 bp ottenuta per allineamento tra le due sequenze EST di orzo. La sequenza include il dominio funzionale del gene (dominio BRX).

-HvRPDI (*Root primordium detective-1*): il gene è stato identificato in *Arabidopsis thaliana* (AB189464; Konishi e Sugiyama, 2006) ed è coinvolto nel mantenimento di un'attiva divisione cellulare a livello dell'apice meristemato dei primordi radicali. In *Arabidopsis thaliana* è stato identificato un mutante per il gene *RPDI*, in cui avviene il blocco della crescita della radici avventizie subito dopo la loro emissione (Konishi e Sugiyama, 2006). Utilizzando il programma “Nucleotide BLAST” di NCBI è stata identificata una sequenza genica di *Oryza sativa* che mostra elevata omologia con il gene *RPDI* di *Arabidopsis thaliana*. La sequenza di riso è stata poi utilizzata per la ricerca di sequenze EST di *Hordeum vulgare* nei database di NCBI e HarvEST (<http://harvest.ucr.edu/>; Wanamaker e Close, 2008). In particolare è stata identificata

una sequenza EST di orzo con alta omologia sia con il gene di *Arabidopsis* che con il gene di riso (BI950951; Wing *et al.*, 2001) che è stata utilizzata per la progettazione dei primer.

- ***HvMIZ1 (mizu-kussei 1)***: il gene *MIZ1* è stato identificato in *Arabidopsis thaliana* e sembra coinvolto nella crescita radicale in risposta alla presenza di un gradiente idrico nel suolo (Kobayashi *et al.*, 2007). Il gene è identificato dal codice At2g41660. La lunghezza del gene è di 1.368 bp e contiene un unico grande esone di 893 bp. La sequenza genomica di *Arabidopsis thaliana* è stata utilizzata come “query” per la ricerca di sequenze omologhe di *Hordeum vulgare* utilizzando il programma “tblastx” di BLAST. È stata identificata una sequenza EST di orzo (CK566950; Zierold *et al.*, 2005) di 700 bp. L’allineamento della sequenza proteica di *MIZ1* di *Arabidopsis* con la sequenza tradotta della EST di orzo ha evidenziato la presenza di elevata omologia tra le due sequenze (valore e : $1e-47$, identità del 59% e somiglianza del 71%); l’allineamento è stato effettuato con l’ausilio della funzione BLAST-2-sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). L’analisi della sequenza di orzo con il programma PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ha consentito di identificare il dominio DUF617 presente anche nel gene *MIZ1* di *Arabidopsis thaliana*. La progettazione dei primers è stata effettuata utilizzando l’EST di orzo.

- ***HvEXPβ1 (Hordeum vulgare expansin β-1)***: è un gene di orzo coinvolto nello sviluppo dei peli radicali; il gene ha quindi un ruolo di rilievo nell’assorbimento di acqua e di sostanze nutritive. In questo caso la sequenza genomica di *Hordeum vulgare* era già disponibile in banca dati (codice GenBank AY351785; Kwasniewski e Szarejko, 2006). La sua lunghezza è di 2.536 bp e contiene quattro sequenze esoniche.

Il “primer design” per tutti i geni precedentemente elencati è stato effettuato con l’ausilio del programma CODDLE, accessibile in rete al sito <http://www.proweb.org/coddle> (Henikoff *et al.*, 2003). Il programma CODDLE aiuta

ad identificare le regioni in cui una sostituzione a singolo nucleotide provoca, con elevata probabilità, riduzione o perdita della funzione della proteina codificata (Till *et al.*, 2003). Al programma devono essere forniti i seguenti dati: A) sequenza del gene da sottoporre ad analisi o codice GenBank (nel nostro caso è stata quasi sempre fornita solo la sequenza di una EST); B) Composto chimico utilizzato per la creazione della popolazione mutagenizzata. Il programma CODDLE non prevede tra le sue opzioni il mutageno da noi utilizzato (azide sodica). Tra le alternative proposte dal programma è stata scelta l'opzione "TILLINGw/EMS(plants)" in quanto l'EMS induce una tipologia di mutazioni analoga a quella dell'azide sodica.

La valutazione della regione nucleotidica per il "primer design" più idoneo al TILLING viene effettuata dal programma sulla base di un punteggio che valuta la probabilità di individuare nella sequenza amplificata mutazioni deleterie (Scoring for Truncation and Missense Mutation) e di un punteggio PSSM (Position Specific Scoring Matrix) volto a valutare l'identità della sequenza in esame con un dominio conservato opportunamente identificato (da "Block database" <http://www.proweb.org/input/>). Il risultato riporta una rappresentazione grafica dell'intera sequenza genica e due grafici che ripercorrono la sequenza identificando per ogni posizione un punteggio per lo "Scoring for Truncation and Missense mutation" e per il PSSM. Il programma seleziona la regione che raggiunge i punteggi più alti in entrambi i casi e fornisce i dati relativi al programma "Primer3" (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) per la progettazione dei primer. Per la progettazione sono stati fissati i seguenti parametri: primers con elevato contenuto in GC (minimo 40%) che amplifichino una regione di ampie dimensioni. Di seguito sono riportate le sequenze dei primer selezionati: per *HvBRX1* la regione amplificata è di 940 bp e include due introni e tre sequenze esoniche: forward: 5'-CAAAGATGGTGGGCTGAGAA-3' reverse: 5'-TCATGTATCCTCGTCCGGTTC-3'); per *HvRPD1* la coppia di primer amplifica una regione di 670 bp (forward: 5'-ATATCCAATGGTGGGAATCAAGG-3'; reverse: 5'-GAGACGGCTCCCAGAAGTC-3'); per *HvMIZ1* è stata selezionata una regione di 580 bp che include una sola

sequenza esonica (forward: 5'-GGCTTCGGTCGGTGTTCCTG-3'; reverse: 5'-TTGGTGGATCGGCCATCAGA-3'); per *HvEXPβ1* la regione selezionata va dal nucleotide 777 e il nucleotide 1.774 della sequenza depositata in GenBank (AY351785) ed include tutti e quattro gli esoni del gene. Gli oligonucleotidi selezionati sono forward: 5'-TGGCGGCTAGTCGAGGCACAC-3' e reverse: 5'-GGAACGAGAACGGGGCTTGA-3'.

5.2 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

La procedura TILLING prevede l'utilizzo di primer marcati con molecole fluorescenti al fine di permettere la visualizzazione degli amplificati sullo strumento ABI3730. I primer marcati sono stati forniti dalla ditta ABI Prism (Applied Biosystems[ABI], Forster City, CA, USA). Il primer "forward" è stato marcato al terminale 5' con il fluorocromo 6-FAM, che assorbe luce a 495 nm di lunghezza d'onda e, una volta eccitato, emette fluorescenza di lunghezza d'onda 517 nm. Il primer "reverse" è marcato con il fluorocromo VIC, che assorbe luce a 530 nm di lunghezza d'onda e emette fluorescenza a 550 nm. I primer marcati e non marcati vengono utilizzati nella reazione di PCR ad una concentrazione finale di 0,35 μM in un rapporto di 3:2 primer marcato : primer non marcato (Sigma-Aldrich Corporation St.louis MI USA). L'utilizzo nella miscela di reazione di primer non marcati, privi dell'ingombro sterico dovuto alla presenza del fluorocromo, consente nelle prime fasi di amplificazione la produzione di una maggiore quantità di substrato che facilita l'appaiamento dei primer marcati. La reazione di amplificazione del gene di interesse viene effettuata in un volume finale di 7,5 μl con 1,5 μl di DNA genomico diluito in piastre da 96 pozzetti. La reazione viene allestita utilizzando il robot TECAN Freedom EVO 100 usando HotStartTaq Master Mix Qiagen (Qiagen S.p.a, Milano, ITALY) ed aggiustando la concentrazione di MgCl₂ (che nella HotStartTaq Master Mix Qiagen è di 1,5 mM) quando necessario, per ottenere l'amplificazione del gene di interesse. La reazione PCR è stata effettuata su un termociclatore GeneAmp PCR system 2720. Il profilo termico di amplificazione utilizzato è in accordo con le indicazioni di Colbert *et*

al. (2001): 95 °C per 15 min (per l'attivazione della Taq); otto cicli di PCR touchdown (95 °C per 1min, da T_m+3 °C a T_m-4 °C con un decremento di 0,7 °C per ciclo per 30 sec, e 72 °C per 1 min); seguono poi 35 cicli: 95 °C per 1 min, $T_m -5$ °C per 30 sec, e 72 °C per 1 min; 72 °C per 10 min; 99 °C per 10 min. Un controllo dell'amplificazione viene eseguito caricando 2 μ l del prodotto di PCR su di un gel di agarosio al 2%.

5.3 DIGESTIONE E PURIFICAZIONE

Per consentire la formazione di appaiamenti eteroduplex, ovvero l'appaiamento tra DNA mutante e DNA di riferimento, gli amplificati devono subire un processo di denaturazione e rinaturazione lenta. A tale scopo si è seguito il seguente profilo termico: denaturazione a 96 °C per 10 min, rinaturazione effettuata partendo da una temperatura di 70 °C con decremento di 0,3 °C ogni 20 sec, fino a raggiungere la temperatura finale di 50 °C.

Dopo la rinaturazione i prodotti di PCR vengono digerite utilizzando Surveyor® Mutation Detection Kit (Transgenomics, Omaha, NE, USA) in accordo con il protocollo descritto da Colbert *et al.*, (2001): la mix di digestione (22,5 μ l) contiene: 0,0625 μ l di nucleasi Surveyor; 0,1 M MgSO₄; 0,1 M HEPES; 0,1 M KCl; 0,02% Triton X-100; 2 μ g/ml di BSA e 5 μ l di reazione PCR. La digestione viene effettuata a 45 °C per 15 minuti (Colbert *et al.*, 2001) e viene interrotta aggiungendo 2,5 μ l di EDTA 150 mM. Al fine di eliminare primer marcati non incorporati e molecole fluorescenti libere in soluzione e quindi migliorare la visualizzazione dei prodotti di digestione è stato eseguito un passaggio di purificazione. La purificazione è ottenuta aggiungendo 30 μ l di etanolo 100% freddo ed incubando la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione per 45 minuti a 2000 xg, l'etanolo viene rimosso invertendo la piastra su di un foglio di carta assorbente e centrifugando 10 secondi a 180 xg. I campioni vengono poi lavati aggiungendo 30 μ l di etanolo 70% freddo e centrifugando la piastra 15 minuti a 2000 xg. L'etanolo viene rimosso invertendo la piastra su di un

foglio di carta assorbente e centrifugando nuovamente per 10 secondi a 180 xg. Infine la piastra viene lasciata asciugare per 15-30 minuti.

Per la successiva corsa elettroforetica su sequenziatore capillare “Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer” i campioni precipitati vengono risospesi in 12 µl di Hi-Di formammide (Applied Biosystems[ABI], Forster City, CA, USA) a cui sono aggiunti 0,05 µl di ABI GS 1200 LIZ size standard (20-1200 bp) (Applied Biosystems[ABI], Forster City, CA, USA). Prima di procedere al caricamento dei campioni viene effettuato un passaggio di 5 minuti a 95 °C per consentire la denaturazione dell’amplificato.

5.4 SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

La separazione dei frammenti è stata effettuata con sequenziatore “Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer” a 96 capillari. Prima del caricamento dei campioni è stata effettuata una fase di pre-corsa per 3 minuti a 15 V. In questo modo si ha la messa a fuoco del capillare da parte della fotocellula che poi consentirà la visualizzazione dei frammenti fluorescenti in corsa elettroforetica (fase di “focusing”). Per ciascun prodotto di amplificazione, 1 µl di soluzione è stato iniettato nel capillare alle seguenti condizioni: voltaggio di iniezione 2 kV, tempo di iniezione 20 sec. Per ogni campione sono stati aggiunti 0,05 µl di un marcatore di peso molecolare (1200 LIZ). L’elettroforesi è stata condotta alle seguenti condizioni: voltaggio di corsa 8 kV per circa 3 h. Lo strumento Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer possiede una fotocellula, all’interno di una finestra di lettura fissa, in grado di percepire l’emissione di fluorescenza a 520 e 550 nm di lunghezza d’onda dovuta alla marcatura dei primers “forward” e “reverse” con i rispettivi fluorocromi 6-FAM e VIC. Durante la corsa elettroforetica i frammenti migrano a velocità diverse in funzione della loro lunghezza, giungendo in prossimità della finestra di lettura in tempi diversi. La visualizzazione della corsa avviene in tempo reale su due differenti “canali di lettura” in funzione della diversa fluorescenza. I dati ottenuti dalla corsa elettroforetica su capillare sono

successivamente analizzati dal software GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystems[ABI], Forster City, CA, USA).

5.5 SEQUENZIAMENTO

Le putative mutazioni individuate tramite analisi TILLING in 2D vengono confermate tramite sequenziamento. La miscela di reazione ed il profilo termico per la preparazione degli amplificati da sequenziare è stata preparata alle stesse condizioni precedentemente descritte. I prodotti PCR valutati mediante controllo di un'aliquota su gel d'agarosio 1,5% in TBE 0,5X e purificati mediante colonnine (Microcon, Centrifugal Filter Devices, YM-50, Millipore) seguendo le indicazioni della casa produttrice. I campioni sono poi stati quantificati in gel d'agarosio 1,5% in TBE 0,5X per confronto con standard di riferimento (DNA del fago λ) e diluiti alla concentrazione finale di 10 ng/ μ l. Sono state poi effettuate due reazioni di sequenziamento per ogni sequenza, utilizzando separatamente i primer "forward" e "reverse", in un volume finale di 15 μ l con 2 μ l di DNA "template" diluito. Le reazioni di sequenza vengono effettuate utilizzando ABI BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[ABI], Forster City, CA, USA) alle condizioni indicate dal produttore, con il seguente profilo termico: per la denaturazione 96 °C per 1 min; seguono poi 25 cicli a 96 °C per 10 sec, 50 °C per 5 sec e infine 60 °C per 4 min. Si ha poi una fase terminale a 72 °C per 10 min.

I campioni sono stati quindi brevemente centrifugati e purificati utilizzando il protocollo di precipitazione con Etanolo/EDTA come descritto precedentemente (vedi paragrafo digestione e purificazione). Successivamente, il pellet ottenuto è stato asciugato sotto vuoto per 40 min e poi risospeso in un tampone contenente formammide deionizzata.

I campioni risospesi in tampone, sono stati denaturati e corsi su Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Le sequenze ottenute sono analizzate dal software Mutation Surveyor (SoftGenetics LLC, PA, USA) e con PARSESNP

(<http://www.proweb.org/parsesnp/>; Taylor e Greene, 2003) al fine di verificare gli effetti che le mutazioni a singolo nucleotide (SNPs) hanno sul prodotto proteico codificato.

6. ANALISI DELLE FAMIGLIE SEGREGANTI M₄ CON MARCATORI CAPS

Alcune delle famiglie M₃ mutanti per i geni *HvBRX1* e *HvEXPβ1*, risultavano segreganti per la mutazione bersaglio. Al fine di individuare ed isolare le piante con la mutazione in omozigosi, 30 piante M₄ per ciascuna linea mutante sono state analizzate mediante un saggio CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; Neff *et al.*, 2002).

Con l'aiuto del programma PARSESNP (Taylor e Greene, 2003) è stato creato, per ogni linea mutante segregante, un elenco completo di tutti gli enzimi di restrizione capaci di discriminare tra assenza e presenza della mutazione puntiforme. Al fine di semplificare la visualizzazione dei prodotti di digestione, sono stati selezionati solo degli enzimi "rare-cutter", che generano tagli a bassa frequenza; a questo scopo è stata effettuata una analisi virtuale dei profili di digestione con il programma RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>). Di seguito si riportano i particolari dell'analisi effettuata sui singoli campioni mutanti.

Mutante *HvBRX1* no. 64

Allo scopo di facilitare ulteriormente la visualizzazione dei prodotti di restrizione è stata progettata una nuova coppia di primer, interna all'amplificato *HvBRX1* originale, centrata sulla mutazione puntiforme. La reazione PCR è stata effettuata con la seguente coppia di primer che amplifica una regione di 294 bp: forward: 5'-GACGCGCTCAATTTATTCTTGGCTGT-3'; reverse: 5'-GTCGATGCCAGCCCCACTGA-3'.

L'enzima di restrizione utilizzato per l'analisi CAPS è *MnlI*, che genera tagli a doppio filamento sette nucleotidi a valle della sequenza CCTC. La presenza della

mutazione puntiforme determina la perdita di un sito di legame dell'enzima. La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 µl, con 200 ng di prodotto di amplificazione e 2 unità di enzima *MnlI* (Fermentas ER1071). La digestione è stata effettuata con un termociclatore GeneAmp® PCR System 2720 ad una temperatura di 37 °C per 8 h. Il blocco della reazione di digestione è avvenuto per denaturazione a 65 °C per 20 min. La visualizzazione dei frammenti è stata effettuata in corsa elettroforetica orizzontale su gel di agarosio al 3% (SeaKem LE Agarose-Cambrex) in tampone TBE 0,5X.

Mutante *HvBRX1* no. 2950

Non essendo disponibili in commercio enzimi di restrizione in grado di riconoscere come sito di legame una sequenza contenente la mutazione puntiforme, la selezione dei mutanti omozigoti è avvenuta utilizzando la strategia dCAPS (derived CAPS). Nella strategia dCAPS vengono utilizzati primers particolari contenenti mancati appaiamenti a singolo nucleotide che inseriscono, in fase di amplificazione PCR, un nuovo sito di restrizione solo nell'amplicone che presenta la mutazione puntiforme. Gli ampliconi vengono digeriti e il polimorfismo, assenza o presenza del sito di taglio, viene rilevato in fase di corsa elettroforetica (Konieczny e Ausubel, 1993). E' disponibile un programma online "dCAPS Finder 2.0" (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) che facilita lo sviluppo di questi marcatori. Fornendo al programma la sequenza della porzione del gene contenete la mutazione di interesse, il programma è in grado di progettare varie coppie di "primer dCAPS". I primer utilizzati per la reazione di amplificazione sono: forward: 5'-ACCACTGGACAAGGAGCGATTACCTCGAT; reverse: 5'-TGGTCGCTCGCGTTGCTGATG-3'. Nella sequenza del primer "forward" è stata evidenziata la posizione del disappaiamento a singolo nucleotide, che inserisce nell'amplicone del genotipo wild-type un sito di taglio dell'enzima di restrizione *MboI*. La presenza della mutazione puntiforme determina la perdita del sito di legame dell'enzima *MboI* e di conseguenza non viene generato nessun taglio enzimatico.

La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 µl, con 200 ng di prodotto di amplificazione e 2 unità di enzima *MboI*. La digestione è stata effettuata ad una

temperatura di 37 °C per 4 h. Il blocco della reazione di digestione è avvenuto per denaturazione a 65 °C per 20 min. La visualizzazione dei frammenti è stata effettuata in corsa elettroforetica orizzontale su gel di agarosio al 3% in tampone TBE 0,5X.

Mutante *HvEXPβ1* no. 934

L'analisi CAPS è stata condotta utilizzando la stessa coppia di primer utilizzata per l'analisi molecolare TILLING. E' stato utilizzato l'enzima di restrizione *BciIV*, che genera tagli a doppio filamento sei nucleotidi a valle della sequenza GTATCC. La presenza della mutazione puntiforme determina la perdita del sito di legame dell'enzima per cui non avviene nessun taglio enzimatico. La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 µl, con 200 ng di prodotto di amplificazione e 1 unità di enzima *BciIV* (Fermentas ER1501). La digestione è stata effettuata ad una temperatura di 37 °C per 2 h. Il blocco della reazione di digestione è avvenuto per denaturazione a 80 °C per 20 min. La visualizzazione dei frammenti è stata effettuata in corsa elettroforetica orizzontale su gel di agarosio al 3% in tampone TBE 0,5X.

Mutante *HVEXPβ1* no. 4537

Anche in questo caso l'analisi CAPS è stata condotta utilizzando la stessa coppia di primer utilizzata per l'analisi molecolare TILLING. E' stato utilizzato l'enzima di restrizione *HaeII*, che genera tagli a doppio filamento nella sequenza di sei nucleotidi PuGCGCPy. La presenza della mutazione puntiforme determina la perdita di un sito di legame dell'enzima. La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 µl, con 300 ng di prodotto di amplificazione e 5 unità di enzima *HaeII* (Fermentas ER0791). La digestione è stata effettuata ad una temperatura di 37 °C per 2 h. Il blocco della reazione di digestione è avvenuto per denaturazione a 80 °C per 10 min. La visualizzazione dei frammenti è stata effettuata analogamente a quanto descritto per i precedenti mutanti.

7. ANALISI BIOINFORMATICA DELLE PROTEINE MUTANTI

Per meglio comprendere l'effetto della mutazione puntiforme individuata nella linea 934 per il gene *HvEXPβ1*, è stato realizzato un modello tridimensionale della proteina mutante al fine di verificare l'effetto della sostituzione aminoacidica sulla struttura terziaria e sul legame con il substrato della reazione enzimatica (glucoarabinosilano). Tale analisi è stata condotta in collaborazione con il Prof. Geoff Fincher dell' "Australian Centre for Plant Functional Genomics" (ACPFPG). La struttura della proteina mutante 934 è stata determinata utilizzando il software Modeler 9v5 (Sali e Blundell, 1993; Sanchez e Sali, 1998) già utilizzato in passato per la descrizione strutturale di altre proteine capaci di interagire con xiloglucani (Hrmova *et al.*, 2008). L'analisi strutturale della proteina ha previsto le seguenti fasi:

- Identificazione di una proteina a struttura tridimensionale nota simile alla proteina del mutante 934 da utilizzare come "modello". La ricerca è stata condotta con i programmi Structure Prediction Meta-Server (Ginalski *et al.*, 2003), SeqAlert (e Bioinformatica Biologici Computing, Weizmann Institute of Science, Israele), Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) e 3D-PSSM Server (Imperial College of Science, Technology & Medicina, Londra, Regno Unito). La proteina più simile appartiene ad una famiglia di β-espansine di polline di *Zea mays* ed è coinvolta nell'allungamento del tubetto pollinico (codice PDB 2hcz; Yennawar *et al.*, 2006).
- Le due proteine ("proteina mutante" e "proteina modello") sono state allineate (Notredame *et al.*, 2000; Devereux *et al.*, 1984). In fase di allineamento le porzioni N- e C-terminali di entrambe le proteine sono state eliminate poiché strutturalmente molto differenti. L'allineamento delle due sequenze 2hcz e 934 ha posto in evidenza la presenza di sei inserzioni/delezioni di lunghezza variabile da 1 a 9 residui aminoacidici. L'allineamento è stato controllato

manualmente per mantenere l'integrità degli elementi strutturali secondari e terziari della proteina. Il calcolo dell'identità e della similarità di sequenza è stato effettuato con l'ausilio del programma BioManager v2.0 (Australian National Genomica Information Service; <http://www.angis.org.au/>).

- Le due sequenze proteiche allineate sono state utilizzate per creare due modelli tridimensionali: uno in presenza ed uno in assenza del substrato della reazione enzimatica (glucoarabinosilano). I modelli tridimensionali definitivi sono stati selezionati tra 60 differenti modelli forniti dal programma. Sono stati scelti i due modelli con il valore più basso dell'indice di "Modeller 9v5 objective function". Un successivo affinamento della struttura tridimensionale è stato condotto con l'ausilio del programma CNS (Brünger e Warren, 1998).

8. RICERCA ED OSSERVAZIONE DI MUTANTI RADICALI

La ricerca delle alterazioni morfologiche a livello radicale è stata condotta su circa 1.000 famiglie M₄ tramite l'osservazione di plantule allevate su carta da filtro (metodo "paper-roll"; Woll *et al.*, 2005). Il metodo si basa sulla crescita delle piantine tra due fogli di carta da filtro opportunamente avvolti allo scopo di formare un unico rotolo ed inumiditi con acqua sterile. Per l'analisi è stato utilizzato il seguente protocollo: ca. 50 semi per famiglia sono stati concitati con il fungicida Panocrine (Makhteshim-agan) al 25% e quindi lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per 48 h. Sono stati utilizzati fogli di carta da filtro extra-rapida 50 x 25 cm. Sul lato di 50 cm di un foglio inumidito con acqua, viene posta una fila di 11 semi distanziati tra loro 4 cm. Tutti i semi vengono adagiati con l'embrione verso il basso ad una distanza di 2 cm dal margine superiore del foglio. Un secondo foglio inumidito viene adagiato sul primo in modo che i semi restino bloccati tra i due fogli di carta da filtro. I due fogli vengono poi arrotolati insieme al fine di lasciare un solo seme per piega del rotolo (paper-roll). I "paper-roll" vengono posti verticalmente in contenitori beaker da 2 l (15 paper-roll per beaker) contenenti 0,25 l di acqua deionizzata. La superficie dei beaker viene coperta

da un sacco di plastica nera. Per avere un confronto fenotipico valido, in ogni beaker è stato posto un paper-roll con seme di Morex “wild-type”. I beaker vengono lasciati una settimana in cella di crescita ad una temperatura di 20 °C e fotoperiodo di 8 ore di buio e 16 ore di luce. Dopo 8 giorni l’analisi fenotipica viene condotta per confronto visivo con un “paper-roll” di Morex “wild-type”. La valutazione fenotipica è stata ripetuta utilizzando lo stesso protocollo (2 repliche di 11 semi/paper-roll) solo per i putativi mutanti identificati durante la prima analisi.

9. ANALISI DEI MUTANTI ALLO STEREOMICROSCOPIO

In collaborazione con la Dott.ssa Szarejko del il Dipartimento di Genetica vegetale dell’Università di Silesia (Polonia) sono state utilizzate tecniche di microscopia per la caratterizzazione di alcuni mutanti della popolazione TILLMore con anomalie nella formazione dei peli radicali. In particolare sono stati analizzati i mutanti per il gene *HvEXPβ1*, identificati mediante strategia TILLING, e i mutanti per i peli radicali identificati mediante strategia “paper-roll”.

Per l’osservazione della morfologia dei peli radicali allo stereomicroscopio, le piante mutanti e le piante wild-type, sono state allevate in condizioni di crescita aeroponica. I semi sono stati sterilizzati in candeggina commerciale diluita al 20% per 20 minuti, successivamente lavati tre volte in acqua sterile e trasferiti in piastre Petri riempite di vermiculite umida. Le piastre sono state lasciate a 4 °C per 8 h e poi trasferite in cella di crescita alla temperatura di 22 °C ± 1 °C per 24 h. Per la coltura aeroponica è stato utilizzato il seguente protocollo: i semi germinati sono stati avvolti in un batuffolo di cotone e posti in tubi di vetro sterili in prossimità dell’estremità aperta (un seme per tubo). Sopra ogni tubo è stato posizionato un nuovo tubo capovolto di uguali dimensioni. I due tubi sono stati poi uniti con l’ausilio di parafilm. La base del primo tubo è stata avvolta con carta stagnola al fine di proteggere le radici dalla luce. Una prima replica di tutte le piantine è stata allevata in cella di crescita per 5 giorni ed una seconda replica per 7 giorni. Le osservazioni al microscopio delle radici delle piantine di 5 e 7 giorni sono state effettuate con lo stereomicroscopio STEMI 2000-C (Zeiss).

Per l'analisi delle immagini è stato utilizzato il programma AxioVision LE (Carl Zeiss).

IV RISULTATI E DISCUSSIONE

1. FREQUENZA E DESCRIZIONE DEI MUTANTI M₃

I risultati riportati in questa tesi si collocano in un contesto più ampio finalizzato all'ottenimento di una popolazione mutagenizzata di orzo da utilizzare come risorsa per analisi di genetica inversa mediante TILLING (risorsa TILLMore). Quindi, al fine di facilitare la comprensione e la discussione dei risultati descritti nel presente lavoro, di seguito vengono brevemente riassunti i principali risultati conseguiti nel corso del triennio 2003-2005.

La popolazione è stata realizzata mediante mutagenesi della cultivar Morex di *Hordeum vulgare* ampiamente diffusa per scopi commerciali soprattutto negli Stati Uniti. È stata scelta questa varietà considerando che si tratta di un genotipo molto usato per la realizzazione di mappe genetiche (Wenzl *et al.*, 2006; Varshney *et al.*, 2007) e per il quale si dispone già di alcune librerie BAC (Yu *et al.*, 2000) e sequenze EST (Druka *et al.*, 2006); essa rappresenta quindi uno dei migliori candidati per un futuro sequenziamento dell'intero genoma di orzo. Come agente mutageno è stata scelta l'azide sodica (NaN₃) come uno dei mutageni chimici più efficaci in orzo (Nilan *et al.*, 1973); è infatti in grado di indurre mutazioni con alta frequenza in questa specie. Questo composto è molto efficiente in quanto raramente induce rotture cromosomiche, ma determina quasi esclusivamente sostituzioni di basi a livello nucleotidico e queste ultime risultano le più utili ai fini dell'ottenimento di mutanti fenotipici vitali (Olsen *et al.*, 1993).

La ricerca ha preso avvio nel marzo 2003 col trattamento di mutagenesi su un lotto di 60.000 semi suddivisi in tre gruppi da 20.000 semi ciascuno trattati con tre diverse concentrazioni di azide sodica (1, 5 e 10 mM); i semi trattati sono poi stati seminati in campo. L'anno successivo (marzo 2004) si è quindi realizzata la popolazione M₂ a partire da 10.000 semi ognuno dei quali derivante da una singola pianta M₁ del trattamento 10 mM. Ca. 5.600 piante M₂ hanno effettivamente raggiunto lo stadio di maturazione e su di esse è stata condotta una preliminare analisi morfologica volta ad individuare le piante con fenotipo alterato rispetto a Morex non trattato. Il confronto ha

evidenziato la presenza di 637 piante varianti pari al 12% della popolazione (Talamè *et al.*, 2008). Nel giugno 2004 si è poi proceduto con la raccolta di tutte le spighe M_2 fertili. Per ciascuna linea M_3 mutante, una porzione del seme è stato seminato in campo nel Febbraio del 2005 ottenendo una popolazione di 4.906 famiglie M_3 disposte in filette, ognuna corrispondente a una diversa pianta M_2 . Delle 637 piante mutanti identificate in generazione M_2 , la maggior parte (ca. 90%) ha prodotto una sufficiente quantità di seme per consentire il passaggio alla successiva generazione. Queste hanno mostrato una elevata uniformità morfologica entro famiglia a dimostrazione che le mutazioni osservate erano fissate in omozigosi già nella generazione precedente. Inoltre, il fenotipo osservato in generazione M_2 è stato quasi sempre riconfermato nella rispettiva famiglia M_3 dimostrando l'elevata componente ereditabile del carattere/i responsabile della variante osservata.

Nel corso della stagione estiva del 2005, tutta la collezione di mutanti M_3 è stata monitorata regolarmente allo scopo di individuare nuove alterazioni fenotipiche e quindi di valutare la qualità della popolazione TILLMore per studi di genetica diretta. A questo scopo l'analisi fenotipica della popolazione è stata condotta durante tutto il suo ciclo di crescita, con particolare attenzione alle fasi di emergenza, tardo accostamento, levata, spigatura e maturazione. E' stato così possibile rilevare complessivamente 1.605 famiglie mutanti, corrispondenti al 32,7%, con variazioni fenotipiche di diversa tipologia: alcune con fenotipo completamente fissato, in cui tutti i membri della famiglia hanno una alterazione morfologica in comune, altre con fenotipo ancora segregante; nel calcolo sono compresi anche i mutanti identificati nella generazione precedente.

Il divario così accentuato nel numero di mutanti individuati nelle due generazioni M_2 ed M_3 può essere dovuto a diverse cause. Innanzitutto, molte delle mutazioni identificate nella M_3 non erano visibili nella generazione precedente poiché mascherate in eterozigosi da alleli funzionali aplosufficienti. Il fenomeno è stato particolarmente evidente nel progetto TILLING in frumento portato a termine da Slade e collaboratori (2005): in questo caso l'effetto tampone dovuto sia all'elevato grado di eterozigosi che

alla poliploidia tipica del genoma di frumento ha determinato la completa assenza di mutanti visibili in generazione M₂. In secondo luogo, le alterazioni morfologiche più fini (leggere alterazioni del colore, altezza della pianta e livello di cerosità) sono maggiormente apprezzabili su una famiglia di piante piuttosto che su singoli individui mutanti. In ultimo, si deve tener presente che l'analisi sulla popolazione M₃ è stata effettuata con maggiore attenzione e con l'aiuto della Dr.ssa Udda Lundqvist, una delle maggiori esperte del settore, già responsabile della classificazione della collezione di mutanti di orzo del Nordic Genetic Resource Centre di Alnard in Svezia (Figura 1).

Tutte le alterazioni identificate sono state suddivise nelle seguenti categorie morfologiche principali: cerosità della superficie, portamento/habitus, data di spigatura, morfologia della foglia, necrosi della foglia, accostamento, colore della pianta, altezza, morfologia della pianta e morfologia della spiga (Figura 2). Alcune delle alterazioni identificate risultano essere potenzialmente interessanti anche sotto il profilo agronomico ed i mutanti corrispondenti potrebbero essere direttamente inserite in programmi di incrocio per il miglioramento genetico della specie. È il caso dei mutanti a statura ridotta, mutanti a diverso grado di cerosità dei tessuti e mutanti e per epoca di fioritura.

Di seguito si riporta una descrizione più approfondita delle singole classi fenotipiche prese in esame. Per ogni categoria vengono segnalate alcune tra le alterazioni più significative utilizzando la stessa nomenclatura impiegata dalla Dr.ssa Udda Lundqvist per la classificazione dei mutanti della Nordic Genetic Resource Centre (il nome dei mutanti è riportato in corsivo). In generale le alterazioni del colore della pianta (27,3%) e variazioni nella morfologia della spiga (20,7%) sono le mutazioni più frequenti nella popolazione TILLMore e complessivamente costituiscono quasi il 50% delle variazioni osservate. E' stato inoltre osservato un numero straordinariamente elevato di mutanti con necrosi fogliari (5,5%). Un riassunto dei risultati ottenuti è riportato in Tabella 1.

- **Colore della pianta e cerosità della superficie**

Le alterazioni nel colore della pianta sono in assoluto le mutazioni individuate con maggiore frequenza nella popolazione TILLMore (il 27% delle famiglie mutanti e il 12% della popolazione totale). Tra queste, una discreta percentuale mostra completa assenza di pigmenti (fenotipo albino). Un primo rilievo allo stadio di due foglie ha portato all'identificazione di 379 famiglie M₃ segreganti albine, e in base a ciò si è stimata una frequenza di albinismo nella popolazione pari al 7,7%. Le famiglie sono tutte segreganti poiché gli individui con fenotipo albino fissato in omozigosi nella precedente generazione M₂ non hanno superato le prime fasi di sviluppo. L'albinismo rientra tra le mutazioni clorofilliane riscontrate con maggiore frequenza in seguito a trattamenti con NaN₃ in *Hordeum vulgare* (Nilan *et al.*, 1976) e in *Oryza sativa* (Afsar Awan *et al.*, 1980); in entrambi gli studi si è evidenziato come un periodo di pre-germinazione dei semi a 20°C, protratto per un numero di ore superiore a otto prima del trattamento determini un incremento di questo tipo di mutazioni. Nel nostro caso, al fine di limitare l'induzione di un eccessivo numero di mutanti clorofilla-deficienti quali gli albini, il periodo a 20 °C ha avuto una durata di 4 ore (Talamè *et al.*, 2008).

Sono state identificate anche alterazioni meno drastiche nel contenuto di pigmenti clorofilliani tra cui mutanti che presentano una colorazione verde meno intensa (mutanti *pale*) ed altri che mostrano una colorazione tendente al giallo denominati *chlorina*. Alcuni mutanti appartenenti a questa categoria mostrano particolari pattern di colorazione: striature verticali di differente colore (mutanti *yellow striped* e *white striped*), chiazze di colore (mutanti *mottled*) e striature orizzontali (mutanti *zebra*). Altri ancora appaiono di un colore verde talmente acceso da apparire alla vista tendente al blu (mutanti *blue-green*). In Figura 3 sono visibili alcune foto di mutanti per il colore della pianta.

Per quanto concerne la categoria di mutanti “cerosità della superficie” (Figura 4) compaiono genotipi con alterato livello di cere a livello del culmo, della spiga e delle foglie; questi mutanti vengono comunemente denominati *eceriferum* (a basso contenuto di cere) o *wax-coated* (ad alto contenuto di cere). I mutanti per la cerosità della superficie sono presenti nella popolazione in numero abbastanza elevato (2,6% della popolazione) tanto da essere considerati una categoria a parte. Mutanti con un alterato

grado di cerosità cuticolare sono già stati descritti in varie specie tra cui *Arabidopsis thaliana* (Koornnef *et al.*, 1989; McNevin *et al.*, 1993), *Zea mays*, *Sorghum bicolor* e *Pisum sativum* (Jenks *et al.*, 1996). Di particolare rilevanza è uno studio condotto su un mutante ad elevato contenuto di cere di *Arabidopsis thaliana* (mutante *shine*); questo mutante presenta un quantitativo di cere sei volte maggiore rispetto al normale ed una densità minore di stomi sulla superficie fogliare (Aharoni *et al.*, 2004). Opportuni esperimenti, condotti in condizioni di limitato apporto idrico, hanno dimostrato che il mutante manifesta maggiore resistenza a stress da carenza di acqua rispetto al genotipo “wild-type” (Aharoni *et al.*, 2004). Questa classe di mutanti potrebbe di conseguenza essere interessante anche per programmi di miglioramento genetico dell’orzo; questa specie, infatti, viene molto coltivata in ambienti marginali e paesi emergenti in cui sono spesso carenti le risorse idriche.

- **Accestimento**

Tale categoria di mutanti include il 12% delle varianti fenotipiche osservate e comprende piante con numero di culmi inferiore a tre (*low tillering*) o, in alcuni casi estremi, con assenza completa di culmi di accestimento (mutanti *uniculmo*). In rari casi, sono state osservate famiglie M₃ con numero di culmi molto maggiore rispetto a Morex non trattato (mutanti *more tillers*), essi però non hanno mostrato un aumento significativo nella produzione; le spighe di questi mutanti infatti hanno dimensioni inferiori al selvatico e presentano un elevato livello di sterilità.

Per quanto riguarda gli aspetti genetici che regolano questo carattere, studi condotti su differenti specie vegetali, tra cui mais, petunia, pisello e *Arabidopsis* (Schmitz e Theres, 1999), hanno messo in luce la presenza di un numero molto elevato di mutanti per l’accestimento con diverse caratteristiche morfologiche. Questi risultati rivelano l’esistenza di un controllo genetico molto complesso per la regolazione e lo sviluppo dei culmi di accestimento. Anche in *Hordeum vulgare* sono stati identificati vari mutanti che mostrano alterazioni per questo carattere (Bossinger *et al.*, 1992) ma, in un solo caso, si è proceduto con la caratterizzazione molecolare; il lavoro è stato effettuato

da Babb e Muehlbauer nel 2003 e riguarda la mappatura del mutante recessivo *uniculmo2* che manca completamente della capacità di sviluppare meristemi ascellari e quindi presenta il solo culmo principale. I mutanti per l'accestimento identificati presso la nostra risorsa potrebbero quindi risultare di grande interesse per condurre studi sugli aspetti genetici che regolano questo carattere e, in futuro, sfruttare queste conoscenze per il miglioramento genetico della specie.

- **Epoca di spigatura**

Questa categoria comprende piante con emissione precoce o tardiva della spiga rispetto al genotipo selvatico e include ca. il 10% delle varianti fenotipiche osservate. Le valutazioni fenotipiche sono state effettuate mediante rilievi giornalieri in fase di levata (durante le prime due settimane di Maggio 2005). Una famiglia M₃ veniva considerata in fase di spigatura quando per il 50% dei culmi di accestimento diventavano visibili le reste. Le famiglie mutanti sono state quindi classificate in quattro categorie distinte: *very early heading* (spigatura da due settimane a una settimana prima del "wild-type"), *early heading* (spigatura in anticipo da tre a sette giorni), *late heading* (spigatura in ritardo di meno di una settimana) e *very late heading* (spigatura in ritardo di più di una settimana). Anche in questo caso i mutanti potrebbero essere direttamente utilizzati in programmi di miglioramento genetico; ad esempio i mutanti *early heading* potrebbero essere utilizzati per lo sviluppo di varietà di orzo a maturazione precoce. E' noto infatti che tra le caratteristiche apprezzate nel moderno ideotipo di orzo è di notevole importanza la capacità di portare a termine più velocemente il ciclo vitale e quindi sfuggire ai periodi estivi più caldi e siccitosi che potrebbero avere ripercussioni negative sulla produzione (es. stretta da caldo). Cereali con un ciclo vitale più breve hanno inoltre maggiore possibilità di evitare problemi connessi a attacchi di patogeni quali ruggine bruna e ruggine nera.

- **Morfologia e dimensioni della foglia**

Comprende il 5% dei mutanti morfologici osservati e prende in considerazione i seguenti descrittori: lamina fogliare con ampiezza differente dal normale (*narrow/broad leaf*), con lunghezza alterata (*short/long leaf*), foglia arricciata (*curly*), arrotolata (*wilty*) e allungata (*elongated*). Alcuni mutanti fogliari a foglia arrotolata o arricciata potrebbero dimostrarsi molto utili: mutanti simili di *Zea mays* sono infatti maggiormente resistenti agli stress da carenza di acqua in quanto limitano al minimo le perdite per traspirazione (Rock e Ng, 1999).

- **Altezza e Portamento della pianta**

Comprende circa il 20% dei mutanti osservati; essi sono stati suddivisi nelle seguenti categorie morfologiche: numero e lunghezza degli internodi (*multinodosum, internode length*), altezza ridotta (*semidwarf, dwarf*), portamento alterato (*prostrated, erect growth, brachytic, bushy*; Figura 5).

Nei cereali, la possibilità di intervenire riducendo l'altezza della pianta, ad esempio introducendo in programmi di miglioramento genetico mutanti a statura ridotta, è strettamente associata alla possibilità di aumentare il livello di produzione. La riduzione dell'altezza dei cereali coltivati è stato infatti uno dei traguardi più importanti del miglioramento genetico classico: l'allevamento di piante a bassa statura ha infatti determinato un aumento consistente della produzione grazie ad una migliore ripartizione dei fotoassimilati (aumento dell'*harvest index*), associato ad una diminuzione delle perdite per allettamento.

- **Mutanti necrotici**

Sono mutanti che presentano necrosi caratteristiche che, in alcuni casi, interessano solo particolari organi (foglie, spiga o culmo) mentre in altri si estendono a tutti i tessuti della pianta. Per questa categoria morfologica è stato identificato nella popolazione TILLMore un numero molto elevato di mutanti: 121 mutanti necrotici corrispondente al 2,5% della popolazione. Per tutte le famiglie identificate è stata

effettuata una completa e dettagliata documentazione fotografica: per ogni mutante è stata fotografata la foglia bandiera e la terzultima foglia emessa (Figura 6). Sono stati altresì annotati i casi in cui le necrosi hanno interessato oltre alle foglie anche il culmo e/o la spiga.

Su una porzione fogliare di tali mutanti sono stati condotti dei saggi in camera umida che hanno confermato l'assenza dei principali agenti patogeni dell'orzo (dati non riportati). Le necrosi sono quindi reazioni ipersensibili indotte in risposta a stress ambientali di tipo biotico o abiotico che determinano la morte incontrollata delle cellule delle piante. Mutanti simili sono stati ampiamente descritti in *Arabidopsis thaliana* (meglio noti come mutanti "lesion mimic"; Lorrain *et al.*, 2003), in *Zea mays* (Johal *et al.*, 1995) e *Triticum spp.* (Kamlofski *et al.*, 2006). Questi mutanti si sono spesso dimostrati maggiormente resistenti all'attacco di patogeni grazie anche alla sovraespressione di molte molecole di difesa (es. PR protein; Lorrain *et al.*, 2003). Ad esempio, in *Triticum aestivum* cv. Sivalocho (una varietà suscettibile alla ruggine bruna) è stato identificato un mutante "lesion-mimic", indotto da trattamento chimico, in grado di resistere agli attacchi di *Puccinia triticina* (Kamlofski *et al.*, 2006). Anche in *Hordeum vulgare* è stato descritto un numero piuttosto elevato di mutanti necrotici (Lundqvist *et al.*, 1997) che mostrano punteggiature e chiazze che differiscono per forma, colore, dimensioni e distribuzione; tale diversità morfologica potrebbe derivare da una risposta ipersensibile a differenti agenti ambientali e quindi riflettere un differente meccanismo biochimico di difesa. In orzo, il legame tra "pathway" difensivo e mutanti necrotici è stato per la prima volta dimostrato per il mutante *mlo* di *Hordeum vulgare* (Wolter *et al.*, 1993) che è in grado di contrastare gli attacchi del patogeno fungino *Erysiphe graminis sp. hordei*. Tutte le piante mutanti per il gene *mlo* risultano essere resistenti poiché rispondono al tentativo di penetrazione dell'ifa fungina con un ispessimento localizzato della parete cellulare. Nel lavoro pubblicato da Wolter e collaboratori è stato dimostrato che sia l'allele mutante (*mlo*) che l'allele selvatico (*Mlo*) sono coinvolti nel meccanismo di difesa contro *Erysiphe graminis* ma apparentemente l'allele mutante è in grado di reagire agli attacchi fungini più

velocemente e con maggiore intensità. Un secondo esempio è il mutante *nec1* di *Hordeum vulgare* caratterizzato dalla presenza di una risposta ipersensibile dovuta alla sovraespressione costitutiva di proteine difensive anche in assenza di organismi patogeni. Da un punto di vista fenotipico il mutante mostra su tutti i tessuti una punteggiatura nera (Rostoks *et al.*, 2006). Gli stessi autori hanno poi clonato il gene *NEC1* responsabile del fenotipo mutante ed hanno scoperto una omologia con il gene *HLM1* di *Arabidopsis thaliana* coinvolto nel meccanismo di resistenza a patogeni mediante risposta ipersensibile.

- **Morfologia della spiga**

I mutanti per la morfologia e l'aspetto della spiga comprendono il 20% dei mutanti identificati e corrispondono a ca. il 9% di tutta la popolazione TILLMore. Le mutazioni interessano un numero molto elevato di descrittori relativi alle dimensioni e all'aspetto della spiga; alcune fotografie emblematiche per questa categoria di mutanti sono state riportate in Figura 7. In tabella 2 sono riportati alcuni esempi di mutanti identificati nella nostra popolazione TILLMore, molti dei quali presentano forte somiglianza con i mutanti identificati presso la collezione della Nordic Genebank (<http://www.nordgen.org/ngb/>; Lundqvist, 2005).

Di seguito sono stati riportati due esempi particolarmente interessanti per lo studio dei meccanismi di sviluppo e organizzazione degli organi fiorali:

- **Mutanti omeotici**: sono mutanti in cui un organo florale è stato trasformato in un altro. Questa classe di mutanti ha avuto un ruolo essenziale nello sviluppo delle conoscenze dei meccanismi molecolari che determinano l'identità degli organi fiorali nelle piante dicotiledoni (modello ABC di *Arabidopsis*; Ng e Yanofsky, 2000) Nella collezione TILLMore sono stati identificati mutanti *lemma-like-glumes* (in cui le glume sono trasformate in lemma), *lemma-like and palea-like-floretorgans* (in cui tutti gli organi fiorali sono convertiti in lemma e palea), *ovary-like stamen* (in cui i tre stami di ogni fiore sono convertiti in ovari) (Figura 8).

- Mutante a crescita indeterminata: quasi tutte le *Poacee* hanno crescita di tipo determinato, ovvero la differenziazione dell'apice riproduttivo pone fine allo sviluppo di nuove foglie e quindi alla possibilità di produrre nuove spighe. Nella popolazione TILLMore è stato identificato un mutante *branched*, in cui la crescita è di tipo indeterminato: la pianta non blocca il suo sviluppo dopo la differenziazione della prima spiga ma produce nuovi culmi laterali (vere e proprie ramificazioni) che portano nuove spighe (Figura 8).

La maggior parte di questi mutanti è già stata ampiamente descritta in letteratura e presenta buona analogia con quelli ottenuti presso lo Scottish Crop Research Institute da Caldwell e collaboratori (2004); questi ultimi hanno rilevato il 13,7% di varianti visibili in una popolazione M₃ derivante dal trattamento con EMS alla concentrazione 30 mM e l'8,6% in una popolazione M₃ derivante dal trattamento a 20 mM. Tali risultati sono paragonabili al 13% rilevato nel nostro caso sulle piante M₂. Caldwell e collaboratori hanno sintetizzato i loro risultati in un database accessibile all'indirizzo internet <http://bioinf.scri.sari.ac.uk/distilling/distilling.html>.

Anche per quanto concerne la risorsa TILLMore è stato allestito una banca dati online contenente un numero molto elevato di informazioni riguardo ai fenotipi osservati e una documentazione fotografica accurata dei principali mutanti identificati; tutte le informazioni sono disponibili al sito www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/. Il sito è stato allestito allo scopo di rendere fruibili le informazioni relative ai fenotipi mutanti osservati a tutti i gruppi di ricerca interessati a svolgere studi di genomica o di miglioramento genetico dei cereali (Figura 9). In questa banca dati è possibile effettuare la ricerca dei mutanti di interesse mediante due approcci: 1) Genetica diretta: vengono elencati i codici di tutte le linee della popolazione TILLMore che mostrano una alterazione morfologica di interesse. L'indagine può essere effettuata per parole chiave (funzione "search for text") o mediante ricerca per categoria (funzione "category list"); 2) Genetica inversa: è possibile effettuare una ricerca partendo dal codice della pianta mutante identificata mediante analisi molecolare TILLING; il

programma fornisce informazioni relative alle alterazioni fenotipiche del mutante corrispondente.

2. FREQUENZA E DESCRIZIONE DEI MUTANTI RADICALI

Al fine di individuare mutanti che presentano un apparato radicale fenotipicamente alterato rispetto a Morex selvatico, un sottogruppo di circa 1.000 famiglie M₄ sono state allevate su carta da filtro (approccio “paper-roll”; Nawrot *et al.*, 2005). L’analisi fenotipica è stata condotta mediante un semplice confronto visivo tra le radici delle linee mutanti con un “paper-roll” di Morex selvatico utilizzato come genotipo di riferimento. Trattandosi di una indagine molto semplice e rapida, è stato possibile identificare solo variazioni macroscopiche visibili ad occhio nudo, quali riduzione rilevante della lunghezza delle radici seminali e modificazioni consistenti nell’aspetto e nel comportamento radicale. Dopo aver individuato attraverso una prima valutazione visiva le famiglie M₄ che presentavano una qualche variazione rispetto a Morex, solo per tali famiglie è stata ripetuta la valutazione fenotipica in “paper-roll” per avere una conferma delle osservazioni effettuate. Utilizzando questo approccio sono state identificate ca. 70 linee mutanti con fenotipo alterato (pari al 7% delle famiglie analizzate), 26 delle quali mostrano un fenotipo stabile o non-segregante (Figura 10). Un elenco delle categorie fenotipiche in cui sono state classificate le famiglie M₄ mutanti per l’apparato radicale è stato riportato in Tabella 3.

Una rilevante porzione (pari al 35%) dei mutanti identificati presenta una riduzione più o meno marcata della lunghezza delle radici seminali; questi mutanti sono stati raggruppati in due differenti categorie: *short root* e *very short root*. In vari casi, questi mutanti a radici corta presentano anche alterazioni morfologiche aggiuntive quali un aspetto arricciato (*curly root*) od un diametro radicale ispessito (*thick root*). Analoghi risultati sono stati ottenuti recentemente in orzo in una popolazione di mutanti M₃ ottenuti mediante trattamento del seme con N-metil-N-nitrosurea (NMU) e azide sodica (Nawrot *et al.*, 2005). In questo esperimento sono stati analizzati, mediante analisi con lo stesso approccio “paper-roll”, nove mutanti che mostravano in generazione M₂ un

fenotipo *dwarf* (nano) o *semidwarf* (seminano). Tutti i nove mutanti analizzati presentavano un evidente accorciamento delle radici seminali. Nel caso di TILLMore, l'analisi è stata invece condotta su 1.000 famiglie scelte a caso nella popolazione senza considerare il fenotipo della porzione epigea della pianta; di conseguenza, la maggioranza dei mutanti identificati (ca. il 70%) presentano alterazioni solo a livello radicale senza ripercussioni su tutti gli altri organi della pianta. La maggioranza delle famiglie mutanti della popolazione TILLMore presentano, quindi, mutazioni in geni coinvolti esclusivamente nello sviluppo delle radici seminali.

La difficile visualizzazione delle strutture minuscole della radice con strategia "paper-roll" ha fortemente limitato la possibilità di individuare alterazioni a livello dei peli radicali; infatti sono solo quattro i mutanti individuati appartenenti a questa categoria morfologica. Questi mutanti sono stati classificati come *hairless* (completamente privi di peli radicali) o *short hair* (allungamento dei peli radicali ridotto). Una fenotipizzazione più approfondita dei mutanti per i peli radicali è stata condotta tramite visualizzazione allo stereomicroscopio ed al microscopio a scansione (Figura 11); dalle immagini risulta evidente che i mutanti *hairless* presentano una superficie della radice seminale perfettamente liscia senza alcun abbozzo di pelo radicale mentre nei mutanti *short hair* l'allungamento dei peli radicali è bloccato nelle prime fasi di sviluppo.

Una indagine simile condotta presso l'Università di Silesia in Polonia su una popolazione di mutanti di orzo allevati in condizioni aeroponiche, ha consentito di identificare 17 mutanti con alterazioni nello sviluppo dei peli radicali (Szarejiko *et al.*, 2005). Oltre alle due categorie di mutanti individuate nella popolazione TILLMore, sono stati identificati mutanti *irregular root hairs* (con peli radicali irregolari) e mutanti *bulges* (in cui la formazione del pelo radicale è bloccata subito dopo la formazione del rigonfiamento cellulare). L'ampia varietà di mutanti per la formazione dei peli radicali mette in luce la presenza di un controllo genetico piuttosto complesso per questo carattere (Szarejiko *et al.*, 2005). Grazie ai risultati ottenuti dagli stessi autori, è stata effettuata la caratterizzazione molecolare di uno dei mutanti *hairless* identificati (*rh11a*) che ha consentito l'isolamento e il clonaggio del gene della β -

esapansina, il primo ed unico gene clonato nei cereali coinvolto nello sviluppo dei peli radicali (Kwasniewski e Szarejiko, 2006). Ad eccezione di questo importante risultato ad oggi sono ancora pochissime le informazioni disponibili sul controllo genetico dello sviluppo dei peli radicali di orzo e, in generale, in tutte le monocotiledoni.

Oltre alle varianti strettamente morfologiche, sono stati identificati due mutanti che presentano un crescita geotropica molto accentuata; una tale alterazione non era stata riportata in precedenza in orzo. Mutanti di *Arabidopsis thaliana* con caratteristiche simili mancano della capacità di percepire altri stimoli come la presenza di un gradiente di umidità nel suolo (Eapen *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007). Di conseguenza, i due mutanti con forte geotropismo, potrebbero in realtà essere due mutanti per geni coinvolti nella risposta ad un gradiente idrico. Comunque, ulteriori studi dovrebbero essere condotti per validare questa ipotesi, poiché la crescita radicale è un carattere complesso fortemente influenzato da fattori ambientali: quali sostanze nutritive, ostacoli, calore, luce e disponibilità idrica (Eapen *et al.*, 2003; Massa e Gilroy, 2003; Eapen *et al.*, 2005).

Per i mutanti che presentano differenze nell'architettura e nella struttura radicale rispetto a Morex non trattato è stato avviato un opportuno programma di incroci per poter fissare ed in seguito eventualmente mappare il fattore ereditario alla base del fenotipo osservato.

3. IDENTIFICAZIONE DI MUTANTI PER GENI COINVOLTI NELLO SVILUPPO E ARCHITETTURA RADICALE

L'analisi molecolare è stata effettuata utilizzando un saggio TILLING basato su taglio enzimatico con nucleasi CelI e visualizzazione dei frammenti con sequenziatore capillare ABI3730. L'analisi molecolare è stata condotta su sull'intera popolazione TILLMore di 4.906 campioni di DNA estratti da altrettante famiglie M₃ ed organizzati secondo uno schema di "pooling" in due dimensioni (Till *et al.*, 2006a). Per l'analisi sono stati scelti geni coinvolti nello sviluppo e nella determinazione della morfologia radicale di *Hordeum vulgare*. In particolare sono stati considerati:

- *Hordeum vulgare* *BREVIS RADIX-1* (*HvBRX1*); il gene omologo di *Arabidopsis thaliana* (*AtBRX1*), è parte di una famiglia multigenica di cinque elementi molto simili fra loro che agiscono nella via biosintetica dei brassinosteroidi della radice (Mouchel *et al.*, 2006). Una mutazione deleteria al gene *AtBRX1* di *Arabidopsis thaliana* determina una drastica riduzione del livello di brassinosteroidi nella radice e determina una riduzione del livello di espressione del 15% dei geni normalmente espressi nei tessuti radicali (Mouchel *et al.*, 2006). A livello macroscopico si osserva una minore crescita della radice primaria e delle radici laterali dovuto ad una limitata divisione cellulare (Mouchel *et al.*, 2004). Gli stessi cinque elementi genici sono stati individuati anche in *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* (Briggs *et al.*, 2006). Tali informazioni dimostrano la presenza di una rilevante conservazione strutturale della famiglia *BREVIS RADIX* tra specie anche filogeneticamente lontane tra loro. L'analisi molecolare TILLING è stata condotta su un frammento di 940 bp di *Hordeum vulgare* che mostra alta omologia sia con il gene *AtBRX1* di *Arabidopsis thaliana* che con il gene *OsBRX1* di *Oryza sativa*; in particolare, rispetto a quest'ultimo gene si è ottenuto, attraverso un confronto tra le due sequenze proteiche effettuato con l'ausilio del programma "bl2seq" di

NCBI, un “e-value” di $5e-49$ (tanto più è basso questo valore tanto più è elevata la probabilità che le due sequenze siano tra loro correlate). Utilizzando lo stesso programma è stato possibile calcolare anche il valore di Identità tra le due sequenze (che riporta la percentuale di aminoacidi identici) e il valore di Similarità di sequenza, in cui vengono incluse nel calcolo percentuale anche le sostituzioni conservative in cui un aminoacido viene sostituito con un altro che presenta simili proprietà biochimiche. I valori di Identità e Similarità tra le due sequenze proteiche sono rispettivamente pari a 70% e 73%.

- *Hordeum vulgare* *ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1* (*HvRPDI*); il gene omologo di *Arabidopsis thaliana* appartiene ad una famiglia multigenica ed è coinvolto nella formazione di radici avventizie. Il mutante di-senso *rpdl* di *Arabidopsis* manca completamente della capacità di produrre radici avventizie (Konishi e Sugiyama, 2006). La completa eliminazione della funzione di *RPDI*, ottenuta mediante l’inserzione di T-DNA, determina la morte della pianta nei primi stadi di sviluppo (l’embrione non attraversa la fase glubulare) a dimostrazione che il gene è coinvolto nel mantenimento di una attiva proliferazione cellulare (Konishi e Sugiyama, 2006). In orzo è stata identificata una sequenza EST utilizzata poi per la progettazione dei primer, che presenta elevata omologia con il gene di *RPDI* di *Arabidopsis thaliana*. Utilizzando la coppia di primer di orzo è stata ottenuto un amplificato di 670 bp su cui è stata condotta l’analisi molecolare.
- *Hordeum vulgare* *β -ESPANSIN 1* (*HvEXP β 1*); è il primo ed unico gene di *Hordeum vulgare* identificato e clonato coinvolto nella formazione dei peli radicali (Kwasniewski e Szarejko, 2006). Alcune cellule radicali si sono specializzate nella formazione di escrescenze tubolari meglio note come peli radicali. Contribuendo all’aumento della superficie radicale queste cellule svolgono un ruolo di rilievo nell’assorbimento dell’acqua e dei nutrienti (Gahoonia *et al.*, 2001). I peli radicali hanno anche un ruolo fondamentale nell’instaurare interazioni simbiotiche tra la pianta e i microorganismi del

suolo, quali *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Long, 1996). Il processo di formazione dei peli radicale è stato caratterizzato quasi esclusivamente in piante dicotiledoni modello (*Arabidopsis thaliana*) mentre quasi nulla è noto per le piante monocotiledoni. In particolare, in orzo è stato dimostrato che il gene *HvEXPβ1* è sottoespresso in due mutanti *hairless*: il mutante *rh11a* (Szarejko *et al.*, 2005), identificato presso l'Università di Silesia, ed il mutante *brb*, identificato dal danese Gahoonia presso la Royal University di Copenaghen (Gahoonia *et al.*, 2001). La progettazione dei primer è stata condotta utilizzando direttamente la sequenza genomica di orzo ed è stata selezionata per l'analisi molecolare una regione di 997 bp.

- *Hordeum vulgare* MIZU-KUSSEII (*HvMIZI*); è stato identificato un mutante di *Arabidopsis thaliana* difettivo nella crescita idrotropica (non percepisce la presenza di un gradiente idrico nel suolo), ma che percepisce la presenza di un campo gravitazionale e quindi presenta una normale crescita gravitropica. Il fenotipo del mutante è il risultato di una mutazione recessiva nel gene *AtMIZI* che codifica per una proteina contenente un dominio caratteristico (dominio *MIZ*; Kobayashi *et al.*, 2007). Mediante ricerca in appropriate banche dati, è stata identificata una sequenza EST di *Hordeum vulgare*, caratterizzata dalla presenza del dominio *MIZ*, con elevata omologia con il gene *AtMIZI* di *Arabidopsis thaliana* (le due proteine mostrano identità di sequenza del 68% e similarità del 70%). La sequenza EST è stata utilizzata per la progettazione di primer per l'amplificazione di una porzione di 580 bp.

Mediante analisi molecolare TILLING di tutta la popolazione, sono stati individuati campioni positivi per tutti i quattro gli ampliconi considerati. Questi campioni, oltre al picco corrispondente all'amplicato non digerito, mostravano in corsa elettroforetica due nuovi picchi a basso peso molecolare, uno per ciascun canale di lettura del sequenziatore ABI3730, come effetto della digestione enzimatica. La somma della lunghezza dei due frammenti individuati nei due canali di lettura, corrispondeva

sempre alla lunghezza complessiva dell'amplificato (Figura 12). In presenza di un risultato positivo il DNA genomico di ogni singolo componente del pool è stato miscelato con una uguale quantità di DNA genomico di Morex "wild-type" e sottoposto alle varie fasi di analisi molecolare TILLING. In questo modo è stato possibile identificare il singolo campione portante la mutazione.

Nel complesso tutte le presunte mutazioni osservate durante la procedura TILLING sono state confermate mediante sequenziamento del DNA; la tecnica TILLING ha inoltre consentito di stabilire la posizione della mutazione con elevata precisione (in un intervallo di ca. 10 bp rispetto alla posizione effettiva del polimorfismo).

La valutazione degli eventi di mutazione è stata effettuata con l'ausilio del programma PARSESNP (<http://www.proweb.org/parsesnp/>; Taylor e Greene, 2003), in grado di identificare il tipo di mutazione avvenuta (non-senso o di-senso) e la gravità dell'evento mutageno. Se la mutazione avviene all'interno di un dominio conservato della proteina il programma è in grado anche di calcolare la diminuzione del punteggio "Position Specific Scoring Matrix" (PSSM). Più è elevata la differenza tra il punteggio PSSM del "wild-type" e quello del mutante, più è alta la probabilità che la mutazione di-senso determini la produzione di una variante deleteria della proteina (Taylor e Greene, 2003). Per i mutanti dei geni *HvBRX1*, *HvRPD1* e *HvMIZ1* non è stato possibile identificare, mediante il programma PARSESNP una variazione nel punteggio PSSM, poiché le mutazioni sono avvenute in porzioni geniche in cui il programma non ha identificato alcun dominio conservato.

HvBRX1: L'analisi TILLING ha consentito di identificare otto linee M₃ che presentano sostituzioni a singolo nucleotide per il gene *HvBRX1*; come è stato riportato in tabella 4, è possibile notare che tutte le mutazioni sono delle transizioni nella direzione da GC ad AT come atteso dall'utilizzo dell'azide sodica come mutageno chimico (Olsen *et al.*, 1993; Talamè *et al.*, 2008). In quattro casi sono state identificate mutazioni a livello di sequenze introniche che vengono eliminate prima della traduzione della sequenza mRNA in proteina e, di conseguenza, con elevata probabilità

non avranno alcun effetto sulla funzionalità della proteina. Le restanti quattro mutazioni sono avvenute all'interno di sequenze esoniche ma solamente in due casi la transizione ha determinato una sostituzione aminoacidica. Particolarmente interessante è la mutazione della linea 64 poiché si tratta di un cambiamento “non-sinonimico” tra un residuo aminoacidico carico negativamente (acido aspartico) ed un aminoacido neutro idrofilico (asparagina) in una posizione della proteina sempre conservata tra tutti i geni *BRX* (Vedi Figura Allineamento 13). Non è stato però possibile attribuire alle due mutazioni un punteggio PSSM ed un punteggio SIFT; infatti i due parametri sono in grado di predire l'effetto di una sostituzione aminoacidica sulla funzionalità della proteina sulla base dell'omologia di sequenza con domini funzionali noti e nessuna delle due mutazioni di-senso identificate coinvolge un dominio conservato (dominio *BRX*; vedi figura 13).

HvRPDI: Complessivamente sono state individuate nove famiglie mutanti cinque delle quali non determinano una sostituzione aminoacidica (mutazioni silenti). In altri quattro casi sono state invece identificate delle mutazioni di-senso che però, sulla base dei punteggi PSSM e SIFT non inducono alterazioni in regioni importanti per la funzionalità della proteina. Per le successive fasi di analisi si è quindi preferito procedere con mutazioni più rilevanti. In tutti i casi abbiamo identificato delle transizioni dello stesso tipo in direzione GC ad AT (Tabella 5).

HvEXPβ1: l'analisi molecolare ha consentito di identificare quattro mutazioni puntiformi in quattro differenti linee M₃ della popolazione TILLMore (Tabella 6). Anche in questo caso sono state identificate delle transizioni da GC ad AT; sono state coinvolte solo porzioni esoniche della sequenza genica. Tre delle mutazioni identificate hanno introdotto nella sequenza proteica delle sostituzioni aminocidiche (mutazioni di-senso), mentre la quarta mutazione non ha determinato alcun effetto sulla struttura primaria della proteina (mutazione silente). Mentre le due mutazioni di-senso delle linee 4537 e 85 sembrano avere un effetto limitato sulla funzionalità della proteina, la transizione indotta nel campione 934 comporta una sostituzione di un aminoacido

neutro a bassissimo ingombro sterico (la glicina) con un aminoacido a lunga catena laterale carica positivamente (l'arginina). Inoltre, la mutazione avviene a livello della sequenza amminoacidica *GlyGlyAlaCysGly* altamente conservata in tutta la superfamiglia delle espanisine (vedi figura allineamento 14), è quindi molto probabile che la mutazione comporti un qualche effetto deleterio. Le stesse considerazioni possono essere dedotte dall'elevato valore del PSSM e dal basso valore di SIFT; infatti una mutazione è da considerarsi deleteria per la funzionalità della proteina se sposta il valore della PSSM di 10 o più unità o anche se sposta il valore di SIFT vicino allo zero (Slade *et al.*, 2005).

HvMIZI: Sono state identificate in tutto quattro mutazioni puntiformi, tre delle quali sono transizioni nella direzione da GC ad AT mentre solo una mutazione è una transversione da GC in TA (Tabella 7). Una delle tre mutazioni di-senso identificate (codice linea 2051) determina la sostituzione di un residuo di glicina con un residuo di glutammato carico negativamente. Questa sostituzione “non-sinonimica” avviene in una posizione molto conservata all'interno del dominio *MIZ* (vedi figura allineamento 15) e potrebbe interferire con la funzionalità della proteina. Particolarmente interessante è la mutazione della linea 286 poiché introduce, al centro della sequenza codificante, un codone di stop (questa tipologia di mutazione è meglio nota come “non-senso”). La presenza di una mutazione non-senso comporta inevitabilmente la perdita della funzione della proteina, anche se non sempre determina un effetto sul fenotipo della pianta. In effetti, la stessa funzione potrebbe essere svolta da altri geni con azione simile ovvero l'effetto della mutazione potrebbe essere espressa solo in determinate condizioni ambientali. Per le quattro mutazioni del gene *HvMIZI* non è stato possibile attribuire un punteggio PSSM e SIFT poiché le informazioni relative ai domini conservati della proteina *MIZI* sono ancora limitate e frammentarie (la proteina è stata descritta solo in *Arabidopsis thaliana*; Kobayashi *et al.*, 2007). Di conseguenza, il programma PARSESNP non è stato in grado di individuare domini funzionali simili da utilizzare come confronto al fine calcolare l'effetto delle mutazioni sulle funzionalità della proteina. Per quanto concerne la figura allineamento (Figura 15), le sequenze di

Zea mays e di *Oryza sativa* del gene *MIZ1* sono state ottenute mediante ricerca in banche dati (es “nucleotide BLAST”) utilizzando come “query” il gene *AtMIZ1* di *Arabidopsis thaliana*.

In Tabella 8 sono stati riassunti i risultati ottenuti mediante analisi molecolare della popolazione TILLMore per i quattro geni descritti.

4. ANALISI DELLE MUTAZIONI IDENTIFICATE

Alla luce dei dati riportati in precedenza è possibile fare alcune considerazioni che consentono di valutare con maggiore accuratezza la qualità della risorsa; a questo scopo è stato analizzato l’effetto del trattamento con l’azide sodica in termini di densità di mutazione indotta e direzione delle mutazioni identificate. Al fine di avere una stima ancora più precisa per questi due parametri sono stati considerati anche dati ottenuti da analisi molecolari per geni non riportati in questa tesi (ad oggi la risorsa TILLMore è stata utilizzata per l’identificazione di varianti alleliche in 16 sequenze codificanti).

4.1 ANALISI DELLA DIREZIONE DELLA MUTAZIONE

Sono già stati descritti in letteratura molteplici esempi di varianti morfologiche indotte dal trattamento con azide sodica (NaN_3), utilizzate prevalentemente per programmi di miglioramento genetico classico (Nilan *et al.*, 1973; Prina e Favret, 1983; Castillo *et al.*, 2001). Per contro, solo in un caso precedente al nostro lavoro, sono state condotte analisi di sequenza al fine di stabilire la tipologia di mutazioni indotte dal trattamento (Olsen *et al.*, 1993). In quest’unico caso si sono analizzate le varianti alleliche, generate dall’azide sodica, per il gene *Ant18* di orzo e sono state osservate transizioni in entrambe le possibili direzioni, anche se quella AT/GC appare essere la più frequente. Inoltre, in rari casi, il trattamento ha prodotto anche delle transversioni in direzione GC/TA ed in direzione AT/TA (Olsen *et al.*, 1993). Nel nostro caso l’analisi è stata effettuata per quattro geni differenti e sono state identificate in totale 25 mutazioni indipendenti il che ci permette di avere una stima abbastanza attendibile

della tipologia di mutazioni indotte. Se però prendiamo in considerazione tutti i 16 geni finora analizzati nella popolazione TILLMore arriviamo ad un totale di 99 mutazioni puntiformi identificate con una frequenza media per gene pari a 6,2. E' stato pertanto possibile valutare con buona accuratezza l'effetto mutageno dell'azide sodica. Per ora sono state rinvenute quasi esclusivamente transizioni da GC ad AT, confermando che le mutazioni osservate sono dovute al trattamento con azide sodica.

Solo in un caso, per il gene *HvMIZ1*, è stata individuata una transversione nella direzione da GC a TA che, in accordo con il lavoro di Olsen e collaboratori, potrebbe essere stata indotta dal trattamento mutageno. Non è però da escludere completamente l'ipotesi che si tratti di un polimorfismo genetico dovuto ad un evento di alloimpollinazione con altre varietà di orzo. In effetti, nonostante l'orzo si riproduca quasi esclusivamente per autofecondazione, è stato calcolato che circa lo 0,5% dei semi in cultivar primaverili di orzo allevate in pieno campo deriva da eventi di fecondazione incrociata (Doll, 1987). Quindi, nonostante la popolazione TILLMore sia stata allevata a opportuna distanza da altri campi coltivati ad orzo, è possibile che un numero molto basso di linee mutanti si siano incrociate con altre cultivar.

4.2 ANALISI DELLA DENSITÀ DI MUTAZIONE

Nel nostro caso, il calcolo della densità di mutazione ha due principali obiettivi: 1) stabilire se il trattamento mutageno ha effettivamente indotto un sufficiente numero di mutazioni per linea, confermando i risultati dei saggi e delle osservazioni fenotipiche effettuati sulle famiglie M₃ 2) valutare l'efficienza del protocollo TILLING basato su taglio enzimatico con CelI e visualizzazione dei frammenti con sequenziatore capillare ABI3730. La densità di mutazione della popolazione TILLMore è stata calcolata dividendo il numero delle basi nucleotidiche sottoposte al saggio molecolare (corrisponde alla lunghezza complessiva dei quattro ampliconi moltiplicato per il numero delle linee totali) per il numero totale delle mutazioni individuate.

Come precedentemente osservato, tutte le mutazioni presenti ad una distanza inferiore alle 80 bp da entrambi i primer utilizzati per l'amplificazione non possono

essere individuate a causa di un forte segnale fluorescente causato da primer non incorporati, dimeri di primer e piccoli amplificati aspecifici, che impediscono la lettura in fase di corsa elettroforetica (Greene *et al.*, 2003). Può quindi essere applicato un fattore di correzione sottraendo 160 bp alla lunghezza di ciascun amplicone analizzato. Applicando questa correzione, la densità di mutazione (ρ_m) può essere calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\rho_m = (\text{Totale bp analizzate} \times \text{Ampiezza della popolazione}) / N^{\circ} \text{ mutazioni totali}$$

Nel nostro caso, applicando la formula ai quattro geni analizzati nell'ambito di questa tesi:

$$\rho_m = (2.547 \text{ bp} \times 4.906 \text{ famiglie}) / 25 \text{ mutazioni}$$

che corrisponde ad una mutazione ogni 499 Kb analizzate. Per ottenere una valutazione più significativa della densità di mutazione che caratterizza la nostra risorsa, risulta però necessario includere nel calcolo tutti i geni finora analizzati; in questo caso otteniamo un valore di ρ_m molto simile al precedente, pari ad una mutazione ogni 478 Kb.

Poiché le dimensioni del genoma di orzo sono pari a ca. di 5.000 Megabasi, è possibile ipotizzare che siano presenti almeno 10.000 mutazioni per genoma e quindi ca. 20.000 mutazioni per famiglia M_3 di cui 200 mutazioni interessano regioni codificanti (Keller e Feulliet, 2000; Panstruga *et al.*, 1998). Inoltre, se si considera che circa il 75% della mutazioni puntiformi che avvengono all'interno di regioni codificanti sono mutazioni di-senso (Lynch, 2007), è possibile ipotizzare che in ciascuna linea sono presenti ca. 150 sostituzioni amminoacidiche. Si può a questo punto effettuare una stima del numero medio di varianti alleliche ottenibili dallo screening della popolazione TILLMore. Nel caso si volesse saggiare una regione di 1 Kb, si otterrebbero, data la frequenza di mutazione sopra citata, ca. 10 varianti alleliche (1 Kb x 4.906 famiglie M_3 / 478 Kb).

E' quindi possibile confrontare la densità di mutazione che caratterizza la risorsa TILLMore con quelle ottenute nell'ambito degli altri progetti TILLING già avviati per

numerose specie vegetali. Una sintesi di questi progetti è visibile in Tabella 9, dove sono riportate le diverse densità di mutazione, espresse come mutazioni per megabasi e calcolate in base ai risultati ottenuti con l'analisi molecolare. L'ambito di variazione osservato è compreso tra un massimo di una mutazione ogni 24 Kb, corrispondente alla densità più elevata, fino ad un valore minimo di una mutazione 1.000 Kb, corrispondente a quella più bassa. Sono indicati inoltre gli aspetti caratterizzanti dell'analisi, quali l'ampiezza della popolazione e il numero di geni saggiati. La densità di mutazione di una mutazione ogni 480 Kb ottenuta in questa ricerca è più alta rispetto a quella ottenuta sulla varietà Optic di orzo da Caldwell e collaboratori (1 mutazione ogni 1.000 Kb), ma più bassa rispetto a quella ottenuta in *Arabidopsis thaliana* da Till e collaboratori (2003). Nel primo progetto TILLING, realizzato su *Arabidopsis*, si è infatti rilevata una densità abbastanza elevata, pari ad una mutazione ogni 170 Kb, risultante dall'analisi di 3.000 individui saggiati per un totale di 192 geni (Greene *et al.*, 2003). In questo caso è stato quindi condotto uno screening molecolare molto accurato, che ha consentito di calcolare con precisione la densità di mutazione. L'ottenimento di una frequenza più elevata rispetto ad analisi condotte in altre specie può essere messa in relazione al fatto che *Arabidopsis thaliana*, pur essendo una pianta a genoma diploide presenta, a differenza dell'orzo, numerose duplicazioni geniche che, per un effetto di ridondanza funzionale, le permettono di sostenere un carico di mutazioni più elevato (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). E' quindi possibile teoricamente utilizzare in *Arabidopsis thaliana* dosi più alte di agente mutageno in modo da incrementare la densità di mutazione senza indurre un'eccessiva letalità. Analoghe considerazioni possono essere effettuate anche nel caso del frumento esaploide o tetraploide, che essendo dotato di più copie di geni omeologhi sui diversi genomi, presenta una ridondanza intrinseca. Ciò rende possibile l'utilizzo di dosi molto elevate di mutageno senza causare un'alterazione consistente a livello fenotipico. Nello studio di Slade e collaboratori (2005) su *Triticum aestivum* e *T. durum* si è ottenuta una densità di mutazione elevata a livello molecolare (rispettivamente di una mutazione ogni 24 e 40 Kb), ma una bassissima percentuale di varianti con fenotipo alterato (< 0,5%). La strategia TILLING permette quindi di valutare direttamente la densità di mutazione

indotta anche in assenza di un fenotipo visibile e, basandosi sulla frequenza di mutazione ottenuta e all'ampiezza della popolazione saggiata, predire il numero di varianti alleliche potenzialmente identificabili esplorando un tratto del genoma di una determinata lunghezza (Slade *et al.*, 2005).

5. ANALISI CAPS DELLE FAMIGLIE MUTANTI

Al fine di valutare l'effetto fenotipico delle mutazioni recessive identificate mediante analisi TILLING, è indispensabile selezionare all'interno di ciascuna famiglia M₃ gli individui portanti la mutazione fissata in omozigosi (Henikoff e Comai, 2003). Nel nostro caso, quasi tutte le mutazioni di-senso individuate per i geni *HvBRX1* e *HvEXPβ1* (quattro su cinque) erano eterozigoti nelle piante in generazione M₂ e quindi segreganti secondo un classico rapporto Mendeliano 1:2:1 nella successiva generazione M₃. Allo scopo di individuare ed isolare gli individui con la mutazione in omozigosi, 30 piante M₃ per ciascuna linea mutante sono state saggiate con l'ausilio di marcatori molecolari CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; Konieczny e Ausubel, 1993).

I CAPS sono marcatori molecolari capaci di discriminare tra presenza o assenza di un polimorfismo a singolo nucleotide mediante taglio enzimatico con enzimi di restrizione (Neff *et al.*, 2002). A questo scopo devono essere scelti enzimi specifici in grado di riconoscere come sequenza bersaglio un sito contenente il polimorfismo a singolo nucleotide. La presenza o l'assenza del polimorfismo/mutazione determina la formazione di un nuovo sito di taglio riconosciuto dall'enzima. La visualizzazione dei frammenti avviene poi in corsa elettroforetica orizzontale su gel di agarosio. I marcatori CAPS sono considerati codominanti, in quanto capaci di discriminare tra gli individui eterozigoti per la mutazione ed entrambi gli omozigoti (mutante e selvatico). In figura 16 è riportata l'analisi mediante marcatore CAPS, di 30 piante M₃ appartenenti alla famiglia mutante 934 del gene *HvEXPβ1*.

In tabella 10 sono riassunti i risultati dell'analisi CAPS per i mutanti di-senso dei geni *HvBRX1* ed *HvEXPβ1*. Il mutante 85 non è stato analizzato perché già fissato in omozigosi.

Le singole piante delle famiglie M₃ analizzate sono state lasciate libere di autofecondarsi ed il seme prodotto da ciascuna pianta è stato raccolto separatamente. In particolare, il seme M₄ prodotto dalle piante omozigoti mutanti, è stato opportunamente conservato per successive analisi fenotipiche al fine di verificare l'effettiva presenza di varianti morfologiche a livello radicale. Lo stesso seme è stato inoltre impiegato per l'avvio di un programma di reincroci con Morex selvatico, con l'obiettivo finale di eliminare tutte le mutazioni supplementari indesiderate che potrebbero interferire con l'analisi fenotipica.

Per quanto concerne i mutanti dei geni *HvRPD1* e *HvMIZ1*, essendo in ordine cronologico gli ultimi due geni analizzati, non è ancora stata effettuata l'analisi mediante marcatori CAPS e non sono quindi disponibili dati ulteriori.

6. PREDIZIONE DELL'EFFETTO DELLE MUTAZIONI DEL GENE *HvEXPβ1* MEDIANTE ANALISI BIOINFORMATICA

Al fine di prevedere l'effetto delle sostituzioni aminoacidiche sulla conformazione della β-espansina di *Hordeum vulgare*, sono state costruite delle immagini tridimensionali delle proteine mutanti (proteine modello) e confrontate per sovrapposizione con una proteina funzionale molto simile a quella dell'orzo "wild-type"; tale proteina ha e a struttura nota ed appartiene alla famiglia delle β-expansine di *Zea mays* (proteina stampo). La "proteina stampo" (accessione PDB numero 2hcz) esibisce una struttura primaria molto simile a quella della β-espansina di *Hordeum vulgare*, infatti i valori di identità e similarità tra le due proteine sono rispettivamente pari al 43% e 59%. È quindi verosimile che anche la struttura secondaria e terziaria siano comparabili. Per valutare l'idoneità della proteina di *Zea mays* come stampo, e quindi determinare quanto le due proteine fossero effettivamente simili da un punto di vista strutturale, sono stati presi in esame diversi parametri tra cui i "G-factors"

(Laskowski *et al.*, 1993). Questa analisi bioinformatica consente di ricostruire tutti i componenti della struttura secondaria e terziaria della “proteina stampo” utilizzando però la sequenza aminoacidica della “proteina modello” al fine di valutare a quanti e a quali aminoacidi non è consentito occupare una determinata posizione della struttura proteica (posizione non-permissiva). L’analisi ha messo in evidenza che solo quattro dei 226 aminoacidi totali delle proteine sono localizzati in regioni non-permissive, mentre il 98% dei residui sono posizionati in regioni assolutamente permissive. La successiva analisi di altri parametri bioinformatici, quali lo “Z-score” (Guex e Peitsch, 1997) che riflette il valore dell’energia potenziale richiesta per il mantenimento della struttura terziaria, ha indicato che la proteina “2hcz” rappresenta un ottimo stampo per il modelling molecolare delle proteine mutanti. Tuttavia, vi sono alcune inserzioni e delezioni nelle sequenze delle “anse” che collegano i singoli elementi di struttura secondaria. Questi elementi di inserzione e delezione sono comunque sempre posizionati nella regione superficiale della proteina e non intervengono direttamente nella reazione catalitica dell’enzima e non collaborano con l’organizzazione della struttura terziaria.

L’analisi strutturale delle proteine mutanti delle linee 4537 e 85 hanno posto in evidenza che le sostituzioni aminoacidiche indotte dal trattamento mutageno avvengono in anse di connessione tra elementi di struttura secondaria e sono situate lontane dal sito catalitico dell’enzima. Presumibilmente quindi le due mutazioni non hanno alcun effetto sulla funzionalità della proteina.

Apparentemente, invece, sembra essere molto promettente la mutazione della linea 934, che introduce nella β -espansina una mutazione di-senso tra un aminoacido neutro a bassissimo ingombro sterico (la glicina in posizione 66 della catena aminoacidica) ed un aminoacido a lunga catena laterale carico positivamente (l’arginina). Inoltre, questa sostituzione aminoacidica interessa una porzione che sembra essere di fondamentale importanza per la funzionalità della proteina; in seguito sono elencate alcune delle osservazioni a supporto di questa ipotesi:

- la glicina in questione è situata all’interfaccia tra due domini della proteina e potrebbe influenzarne la conformazione terziaria finale;

- la glicina è nelle immediate vicinanze del sito di legame con il substrato della reazione (glucoarabinosilano o GAX);
- la posizione della glicina nella proteina è conservata al 100% in tutte le sequenze della superfamiglia delle espansine (Sampedro e Cosgrove, 2005);
- la carica positiva dell'arginina potrebbe favorire il legame con i residui di acido glucuronico della molecola di glucoarabinosilano. La presenza di questo aminoacido potrebbe, quindi, modificare la forza di legame con il substrato della reazione enzimatica.

Purtroppo, dall'analisi strutturale della proteina in esame, si deduce che la mutazione di-senso presente nella linea 934 potrebbe non interferire con la funzionalità della proteina. Infatti, la presenza di un residuo di arginina al posto della glicina nella posizione 66 della sequenza aminoacidica sembra non inficiare la formazione del ponte disolfuro conservato tra le cisteine 65 e 94 situato nelle vicinanze (il modello è permissivo nei confronti della arginina 66, vedi Figura 17A). Il “modello” infatti mostra che l'integrità del ponte disolfuro viene mantenuta e che la catena laterale del residuo di arginina rimane esposta sulla superficie della proteina. Inoltre, tutti e tre i ponti disolfuro, considerati indispensabili per il corretto ripiegamento delle strutture secondarie della proteina, vengono mantenuti in entrambe le strutture. (Figura 17A).

Essendo noto il modello della proteina della β -espansina di *Zea mays* nel complesso con il substrato della reazione enzimatica (glucoarabinosilano o GAX), è stato possibile determinare anche la struttura della proteina 934 nel complesso con questo polisaccaride. Il modello molecolare pone in evidenza che l'arginina potrebbe essere posizionata in modo da evitare ogni impedimento sterico tra la sua catena laterale e i residui xilosilico o glucuronilico di GAX (Figura 17B).

Si può concludere dal modello molecolare della proteina mutante, che l'integrità del ponte disolfuro tra le cisteine 65 e 94 viene preservata e che, grazie alla conformazione rilassata della proteina, l'arginina 66 potrebbe non disturbare l'interazione della proteina con GAX. Di conseguenza, sulla base dell'analisi bioinformatica parrebbe

possibile che la proteina 934 abbia una corretta funzionalità. Tali analisi sono state condotte in stretta collaborazione con il Prof. Geoff Fincher dell' Australian Centre for Plant Functional Genomics recentemente in visita presso il nostro dipartimento.

7. ANALISI FENOTIPICA DEI MUTANTI RADICALI

Nonostante i risultati poco incoraggianti ottenuti con lo studio bioinformatico, esistono comunque buone possibilità che la proteina mutante 934 funzioni in maniera differente rispetto alla proteina selvatica. Per verificare questa ipotesi si potrebbe procedere con un saggio funzionale della proteina della β -espansina. A questo scopo si potrebbe procedere prelevando un espianto di tessuti epiteliali da una porzione della pianta in attiva divisione cellulare e sottoponendolo ad un trattamento al calore per eliminare tutte le cellule vitali e tutte le attività enzimatiche, senza compromettere la struttura della parete cellulare. L'espianto deve poi essere bloccato e mantenuto in tensione su uno strumento chiamato "estensiometro" che ha la capacità di misurare microscopiche variazioni nella lunghezza provocate dall'aggiunta di β -espansine esogene (Sampedro e Cosgrove, 2005). Purtroppo questi saggi non sono facilmente eseguibili senza una adeguata strumentazione ed una buona preparazione tecnica e risultano spesso non molto affidabili e poco ripetibili (Sampedro e Cosgrove, 2005).

È stato quindi scelto un approccio più semplice basato sulla osservazione diretta dei peli radicali delle piante mutanti a confronto con i peli radicali di Morex "wild-type". Per queste osservazioni, 30 piante della linea mutante 934, sono state allevate in coltura aeroponica al fine di evitare ogni possibile interferenza con la crescita dei peli radicali. Sono state poi prelevate delle porzioni della lunghezza di 1 cm dalla parte terminale dalle radici delle piantine di 5 e 7 giorni ed analizzate allo stereomicroscopio.

Rispetto alle piantine di Morex selvatico risulta evidente che i peli radicali del mutante 934 dell'espansina appaiono visibilmente ridotti (Figura 18). Rispetto al pelo di lunghezza normale di 3-5 mm, i mutanti della linea 934 mostrano una riduzione di circa il 70%: i peli hanno infatti una lunghezza media di 1-2 mm e rientrano nella categoria di mutanti *rhs* (*Root short hairs*; Szarejko *et al.*, 2005). Rispetto al mutante

identificato da Kwasniewski e Szarejko, completamente privo di peli radicali, il mutante identificato presso la risorsa TILLMore sembra avere un effetto meno drastico sul fenotipo. In effetti, nel mutante *rh11a* identificato presso l'Università di Silesia non è compromesso il gene dell'espansina, che infatti si presenta normale al sequenziamento, ma è coinvolta una sequenza a regolatrice che interviene "a monte" dell'espressione del gene e ne reprime completamente l'espressione (Kwasniewski e Szarejko, 2006). Il fattore regolativo, oltre a ridurre il livello di espressione dell'espansina, potrebbe avere ripercussioni anche su altri geni coinvolti nello stesso meccanismo e avere un effetto sul fenotipo più drastico. Inoltre va sottolineato che sia la popolazione TILLMore che la popolazione di mutanti ottenuta da Kwasniewski e Szarejko sono state ottenute mediante trattamento con agenti chimici i quali inducono variazioni puntiformi con effetto molto variabile sulla funzionalità delle proteine: da simile al selvatico fino a fenotipo letale per completa non-funzionalità della proteina. E' tuttora in corso una collaborazione con la Dott.ssa Szarejko per l'analisi di questo mutante al microscopio elettronico a scansione.

Inoltre, i risultati ottenuti, seppur promettenti, non possono essere considerati ancora definitivi: infatti risulta indispensabile prima di azzardare qualunque ipotesi, procedere con diverse generazioni di reincrocio con lo scopo di eliminare tutte le mutazioni indesiderate presenti nella linea mutante. Il fenotipo "pelo radicale accorciato" potrebbe infatti essere ascrivibile anche ad altri geni mutati.

V CONCLUSIONI

1)- Analisi fenotipica della popolazione TILLMore per il riconoscimento di varianti morfo-fisilogiche per caratteri di interesse

- Il trattamento mutageno con azide sodica ha indotto una buona frequenza di varianti visibili a livello fenotipico (pari a ca. il 33% della popolazione) senza tuttavia determinare un eccessivo livello di sterilità o di letalità. Mediante osservazioni effettuate in campo sulle piante M₃ nelle principali fasi del loro sviluppo, è stato possibile identificare diversi fenotipi mutanti riconducibili a dieci categorie principali: cerosità della superficie, portamento/habitus, data di spigatura, morfologia della foglia, necrosi della foglia, accestimento, colore della pianta, altezza, morfologia della pianta e morfologia della spiga. Particolare attenzione è stata riservata ai mutanti necrotici ed ai mutanti morfologici della spiga che rappresentano rispettivamente il 2,5% e il 9% della popolazione TILLMore; per queste due categorie di mutanti è stata prodotta una completa documentazione fotografica.
- Un sottogruppo di ca. 1.000 linee appartenenti alla popolazione TILLMore è stato saggiato mediante un approccio “paper-roll” al fine di identificare delle varianti morfologiche a livello radicale. Nel complesso sono state identificate ca. 70 linee mutanti che mostrano le seguenti principali alterazioni morfologiche: accorciamento o ispessimento della radice, arricciamenti radicali, assenza di peli radicali e accentuata crescita geotropica.

La popolazione TILLMore rappresenta quindi una risorsa di grande interesse anche per analisi genetiche condotte con un approccio diretto (forward genetics) o anche per l'avvio di programmi di miglioramento genetico della specie orzo. A questo scopo è stata recentemente allestita una pagina web relativa alla risorsa TILLMore per la classificazione e la descrizione di tutti i mutanti fenotipici osservati in generazione M₃. Questo lavoro è stato effettuato al fine di consentire una miglior fruibilità della risorsa

anche da parte di altri gruppi di ricerca interessati a studi di genomica in *Hordeum vulgare* ed in generale in tutte le *Triticeae*. Tutte le informazioni sono attualmente disponibili al sito <http://www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/>.

2) Analisi di geni coinvolti nello sviluppo dell'apparato radicale mediante approccio TILLING

- Il saggio molecolare TILLING basato su taglio enzimatico e visualizzazione dei frammenti su sequenziatore capillare ABI3730 ha permesso di identificare 25 potenziali mutanti per i geni *HvBRX1* (*Brevis Radix1*), *HvEXPβ1* (*Expansin β-1*), *HvRPD1* (*Root Primordium Defective-1*) e *HvMIZ1* (*Mizu-kussei1*), tutti coinvolti nel corretto sviluppo e nella determinazione dell'architettura dell'apparato radicale di *Hordeum vulgare*. In un secondo tempo, tutte le presunte mutazioni individuate sono state confermate tramite sequenziamento. L'analisi delle sequenze ha permesso infine di verificare la presenza in tutti i casi tranne uno, di transizioni in direzione da GC ad AT.
- I risultati dell'analisi molecolare hanno permesso di valutare che la densità di mutazione nella popolazione TILLMore è pari ad una mutazione ogni 0,48 Mb di genoma saggiato, una frequenza di mutazione piuttosto elevata, ed equiparabile a quanto riportato in letteratura, che permette di valutare positivamente l'efficacia del trattamento mutageno effettuato. Opportune valutazioni, che prendono in considerazione le dimensioni della porzione codificante del genoma di orzo (Keller e Feulliet, 2000) e la probabilità che una mutazione puntiforme comporti una sostituzione aminoacidica (Lynch, 2007), consentono di stabilire che ogni linea presenta in media 150 mutazioni "di-senso".
- Un'attenta analisi al microscopio ottico e a scansione ha posto in evidenza delle carenze nella formazione dei peli radicali per un mutante "di-senso" del gene *HvEXPβ1*. Szarejko e collaboratori dell'Università di Silesia avevano dimostrato, nell'ambito di un precedente progetto di ricerca, che il gene

HvEXPβ1 è sottoespresso in alcuni mutanti privi di peli radicali (*rh11a*; *root hairless 1a* e *brb*; *bald root barley*), ma non era mai stato dimostrato un suo coinvolgimento diretto nella manifestazione del fenotipo *hairless* (il gene appariva perfettamente funzionale). La presenza di una correlazione tra la mutazione puntiforme e il fenotipo *hairless* da noi evidenziate, anche se non in modo definitivo, potrebbe fornire la prova definitiva del coinvolgimento del gene *HvEXPβ1* nella formazione dei peli radicali.

I risultati appena descritti consentono di formulare le seguenti considerazioni conclusive: il protocollo TILLING basato su digestione enzimatica e visualizzazione dei frammenti su sequenziatore caillare si è dimostrato molto efficiente per l'individuazione di mutazioni puntiformi per i geni considerati. Infatti, rispetto alla strategia TILLING basata su visualizzazione su sequenziatore LiCOR, questo nuovo protocollo risulta essere più veloce e facilmente automatizzabile. Inoltre la sensibilità della tecnica consente di identificare un numero di mutazioni equiparabile a quella evidenziata con la strategia LiCOR. Inoltre, l'analisi effettuata per i 16 geni finora analizzati, ha permesso di verificare la presenza, in quasi tutti i casi, di transizioni di tipo GC/AT confermando che le mutazioni osservate sono dovute al trattamento con azide sodica (Olsen *et al.*, 1993) e non a fenomeni di alloincrocio con altre varietà di orzo.

Un'analisi fenotipica preliminare per il mutante 934 del gene *HvEXPβ1* ha consentito l'identificazione di un fenotipo *short root hair*. Nonostante questo primo risultato sia molto incoraggiante, al fine di dimostrare una effettiva correlazione tra genotipo mutante e fenotipo saranno necessari ulteriori passaggi di analisi. La mutagenesi chimica infatti introduce un numero considerevole di mutazioni puntiformi nel genoma, di conseguenza, oltre alla mutazione oggetto di studio, saranno presenti numerose mutazioni supplementari che potrebbero complicare l'analisi del fenotipo (mutazioni di background). Al momento, prima di effettuare nuove e più approfondite analisi fenotipiche, si sta procedendo con l'attuazione di diversi cicli di reincrocio con il

genotipo non-mutato (Morex “wild-type”) al fine di eliminare od almeno ridurre il numero delle mutazioni supplementari.

VI BIBLIOGRAFIA

Aberg E. *Hordeum agriocrithon* nova so a wild sixrowed barley. *Ann. R. Agric. Col. Swed.* 1938. 159-216.

Adams M.D. and Sekelsky J.J. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.* 2002. 3(3): 189-198. Review.

Afsar Awan M., Konzak C.F., Rutger J.N. and Nilan R.A. Mutagenic effects of sodium azide in rice. *Crop science.* 1980. 20: 663-668.

Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., van Arkel G. and Pereira A. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2004. 16(9): 2463-2480.

Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J. and Chen H. Genome-wide mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science.* 2003. 301: 653-657.

An C., Lee S., Kim S-H. and Kim S-R. Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant and Cell Physiol.* 2005. 46: 14-22.

Babb S. and Muehlbauer G.J. Genetic and morphological characterization of the barley *uniculm2 (cul2)* mutant. *Theor. Appl. Genet.* 2003. 106: 846-857.

Badr A., Muller K., Schäfer-Pregl R., El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H.H., Pozzi C., Rohde W. and Salamini F. On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 2000. 17(4): 499-510.

Beetham P.R., Kipp P.B., Sawycky X.L., Arntzen C.J. and May G.D. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. 96: 8774-8778.

Becker J., Vos P., Kuiper M., Salamini F. and Heun M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet.* 1995. 249(1): 65-73.

Bentley A., MacLennan B., Calvo J. and Dearolf C.R. Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics.* 2000. 156: 169-1173.

Bianchi A. and Marocco A. Mutagenesi sperimentale, In *Genetica dei cereali*, Edizioni Agricole, Bologna. 1989. 447-461.

Bingham P.M., Levis R. and Rubin G.M. Cloning of DNA sequences from the white locus of *D. melanogaster* by a novel and general method. *Cell*. 1981. 25(3): 693-704.

Bossinger G., Lundqvist U., Rohde W.F. and Salamini F. Morphology and histogenesis in the grasses. In Munck L (eds.) *Barley genetics VI*, Munksgaard International Publishers Ltd. 1992. 2: 989-1021

Bowers J.E., Chapman B.A. and Paterson A.H. Revealing angiosperm diversity toward a "Gene Revolution". In: Tuberosa, R., Phillips R. L. and Gale, M. (eds.) *Proceedings of an International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution"*, Bologna, Italy. 2005. 79-90.

Bright S.W.J., Kueh J.S.H., Franklin J. and Miflin B.J. Proline- accumulating barley mutants. In *Barley genetics IV*, Proc. 4th Int. Barley Genet. Symp., Edimburgh. 1981. 858-863.

Briggs G.C., Mouchel C.F. and Hardtke C.S. Characterization of the plant-specific BREVIS RADIX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiol*. 2006. 140(4): 1306-1316.

Brünger A.T. and Warren G.L. Crystallographic and NMR system: a new software suit for macromolecular structure determination. *Acta Cryst*. 1998. D54: 905-921.

Bruntell T.P. Transposon tagging in maize. *Funct.Integr.Genomics*. 2002. 2: 4-12.

Caldwell D.G., McCallum N., Shaw P., Muehlbauer G.J., Marshall D.F. and Waugh R. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J*. 2004. 40(1): 143-150.

Castiglioni P., Pozzi C., Heun M., Terzi V., Müller K.J., Rohde W. and Salamini F. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics*. 1998. 149(4): 2039-2056.

Castillo A.M., Cistue L., Valles M.P., Sanz J.M., Romagosa I. and Molina-Cano J.L. Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant cell reports*. 2001. 20: 105-111.

Ceccarelli S., Grando S. and Van Leur J.A.G. Barley landraces in the Fertile Crescent offer new breeding options for stress and environments. *Diversity*. 1995. 11: 112-113.

Colbert T., Till B.J., Tompa R., Reynolds S., Steine M.N., Yeung A.T., McCallum C.M., Comai L. and Henikoff S. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol*. 2001. 126(2): 480-484.

Comai L. and Henikoff S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J*. 2006. 45: 684-694.

Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R. and Henikoff S. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J*. 2004. 37: 778-786.

Conti S., Noli E., Salvi S. and Sanguineti M.C. S1 family recurrent selection based on genetic male-sterility in winter barley. *Agr. Med*. 1997. 127: 153-161.

Cooper L.D., Marquez-Cedillo L., Singh J., Sturbaum A.K., Zhang S., Edwards V., Johnson K., Kleinhofs A., Rangel S., Carollo V., Bregitzer P., Lemaux P.G. and Hayes P.M. Mapping Ds insertions in barley using a sequence-based approach. *Mol.Gen.Genet*. 2004. 272: 181-193.

Cooper J.L., Till B.J., Laport R.G., Darlow M.C., Kleffner J.M., Jamai A., El-Mellouki T., Liu S., Ritchie R., Nielsen N., Bilyeu K.D., Meksem K., Comai L. and Henikoff S. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol*. 2008. 24: 8-9.

Corpuz L.M., Heyne E.G. and Paulsen G.M. Increasing grain protein content of hard red winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by mutation breeding. *Theor. Appl. Genet*. 1983. 65: 41-46

Close T.J., Wing R., Kleinhofs A. and Wise R. Genetically and physically anchored EST resources for barley genomics. *Barley Genetics Newsletter*. 2001. 31: 29-30.

Crispi M.L., Ulrich S.E. and Nilan R.A. Investigation of partial sterility in advanced generation, sodium azide-induced lines of spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 1987. 74: 402-408.

Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Moussy F., Burstin J., Savoie V., Aubert G., Brunaud V., de Oliveira Y., Guichard C., Thompson R. and Bendahmane A. UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol.* 2008. 9(2): R43.

de Dorlodot S., Forster B., Pagès L., Price A., Tuberosa R. and Draye X. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci.* 2007. 12(10): 474-481.

Desai N. A. and Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003. 26: 457-491.

Devereux J., Haeberli P. and Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 1984. 12: 387-395

Diaz-Pendon J.A., Truniger V., Nieto C., Garcia-Mas J., Bendahmane A. and Aranda M.A. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*. 2004. 5: 223-233.

Doll H. Outcrossing rates in autumn and spring-sown barley. *Plant Breed.* 1987. 98(4): 339-341.

Draper B.W., McCallum C.M., Stout J.L. and Moens C.B. A high-throughput method for identifying ENU-induced point mutation in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2004. 77: 91-112.

Druka A., Muehlbauer G., Druka I., Caldo R., Baumann U., Rostoks N., Schreiber A., Wise R., Close T., Kleinhofs A., Graner A., Schulman A., Langridge P., Sato K., Hayes P., McNicol J., Marshall D. and Waugh R. An atlas of gene

expression from seed to seed through barley development. *Funct Integr Genomics*. 2006. 6(3): 202-211.

Eapen D., Barroso M.L., Campos M.E., Ponce G., Corkidi G., Dubrovsky J.G. and Cassab G.I. A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2003. 131(2): 536-546.

Eapen D., Barroso M.L., Ponce G., Campos M.E. and Cassab G.I. Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends Plant Sci*. 2005. 10(1): 44-50. Review.

Eggum B.O. Protein quality of induced high lysine mutants in barley. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1978. 105: 317-341.

Eriksson G. Induction of waxy mutants in maize by acute and chronic gamma irradiation. *Hereditas*. 1963. 50: 161-178.

Feldmann K.A., Malmberg R.I. and Dean C. Mutagenesis in *Arabidopsis*. In Meyerowitz E.M. and Somerville C.R. (eds). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1994. 137-172.

Feuillet C. and Keller B. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann Bot (Lond)*. 2002. 89(1): 3-10. Review.

Fu D., Uauy C., Blechl A. and Dubcovsky J. RNA interference for wheat functional gene analysis. *Transgenic Res*. 2007. 16(6): 689-701. Review.

Gahoonia T.S., Nielsen N.E., Joshi P.A. and Jahoor A. A root hairless barley mutant for elucidating genetic of root hairs and phosphorus uptake. *Plant Soil*. 2001. 235: 211-219.

Gilchrist E.J., Haughn G.W., Ying C.C., Otto S.P., Zhuang J., Cheung D., Hamberger B., Aboutorabi F., Kalynyak T., Johnson L., Bohlmann J., Ellis B.E., Douglas C.J. and Cronk, Q.C. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology*. 2006. 15: 1367-1378.

Ginalski K., Elofsson A., Fischer D. and Rychlewski L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics*. 2003. 19: 1015-1018.

Giuliani S., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Bellotti M., Salvi S. and Landi P. Root-ABA1, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes. *J. Exp. Bot.* 2005. 56 (422): 3061-3070.

Goff S.A. Collaborating on the rice genome. *Science*. 2002. 296: 45.

Gottwald S., Kugelmann E., Kumlehn. and Stein N. TILLING in two-rowed spring barley: mutation frequencies and phenotypes. Proceedings of an International Congress "FAO/IAEA International Symposium in Induced Mutations in Plants". 2008. 95.

Greene E.A., Codomo C.A., Taylor N.E., Henikoff J.G., Till B.J., Reynolds S.H., Enns L.C., Burtner C., Johnson J.E., Odden A.R., Comai L. and Henikoff S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*. 2003. 164(2): 731-740.

Guex N. and Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997. 18: 2714-2723

Gustafsson A. Productive mutations induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*. 1963. 50: 211-263.

Hanin M. and Paszkowski J. Plant genome modification by homologous recombination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. 6: 157-162.

Hao Z. and Ichii M. A mutant RM109 of rice (*Oryza sativa* L.) exhibiting altered lateral root initiation and gravitropism. *Jpn J. Crop. Sci.* 1999. 68: 245-252.

Henikoff S. and Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu.Rev.Plant Biol.* 2003. 54: 375-401.

Henikoff S., Till B.J. and Comai L. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.* 2004. 135: 630-636.

Hetz W., Hochholdinger F., Schwall M. and Feix G. Isolation and characterization of *rct5*, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. 1996. *Plant J.* 10(5): 845-857.

Himelblau E., Gilchrist J., Buono K., Bizzell C., Mentzer L., Vogelzang R., Osborn T., Amasino R.M., Parkin I.A.P. and Haughn G.W. Forward and reverse genetics of rapid-cycling *Brassica oleracea*. TAG. 2009. in press.

Hirochika H. Retrotransposons of rice as a tool for forward and reverse genetics. *Molecular Biology of Rice*. 1999. 43-58.

Hirochika H. Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 2001. 4: 118-122.

Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P. and Sussman M.R. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*. 1998. 280: 918-921.

Ho K.M. and Kasha K.J. Genetic Control of Chromosome Elimination during Haploid Formation in Barley. *Genetics*. 1975. 81(2): 263-275.

Hochholdinger F. and Feix G. Early post-embryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrr1*. *Plant J.* 1998. 16: 247-255.

Hochholdinger F., Park W.J., Sauer M., Woll K. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 2004. 9(1): 42-48. Review.

Hochholdinger F., Park W.J. and Feix G.H. Cooperative action of SLR1 and SLR2 is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiology*. 2001. 125(3): 1529-1539.

Hrmova M., Farkas V., Harvey A.J., Lahnstein J., Wischmann B., Kaewthai N., Ezcurra I., Teeri T.T. and Fincher G.B. Substrate specificity and catalytic mechanism of a xyloglucan xyloglucosyl transferase *HvXET6* from barley (*Hordeum vulgare* L.). *FEBS Journal*. in press.

Hua J. and Meyerowitz E.M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 1998. 94: 261-271.

Ichii M. and Ishikawa M. Genetic analysis of newly induced short-root mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 1997. 47: 121-125.

Ichii M. Characterization of a root hair defective mutant in rice. *Breed. Res.* 2000. 2: 137.

Iida S. and Terada R. A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Current opinion in plant Biology.* 2004. 15: 132-138.

Inukai A.Y., Miwa M., Nagato Y., Kitano H. and Yamauchi A. Characterization of Rice Mutants Deficient in the Formation of Crown Roots. 2001a. *Breeding Science* 51: 123-129.

Inukai A.Y., Miwa M., Nagato Y., Kitano H. and Yamauchi A. RRL1, RRL2 and CRL2 loci regulating root elongation in rice. *Breeding Science.* 2001b. 51: 231-239.

Izawa T., Ohnishi T., Nakano T., Ishida N., Enoki H., Hashimoto H., Itoh K., Terada R., Wu C. and Miyazaki C. Transposon tagging in rice. *Plant Mol.Biol.* 1997. 35: 219-229.

Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F. and Wincker P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 2007. 449: 463-467.

Jenkins M.T. Heritable characters of maize XXXIV-rootless. *J. Hered.* 1930. 79-80.

Jenks M.A., Rashotte A.M., Tuttle H.A. and Feldmann K.A. Mutants in *Arabidopsis thaliana* altered in epicuticular wax and leaf morphology. *Plant Physiol.* 1996. 110: 377-385.

Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H. and Jeong D.H. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* 2000. 22: 561-570.

Johal G., Hulbert S. and Briggs S. Disease lesion mimics of maize: a model for cell death in plants. *Bioessays.* 1995. 17: 685-692

Kamlofski C.A., Antonelli E., Bender C., Jaskelioff M., Danna C.H., Ugalde R. and Acevedo A. A lesion-mimic mutant of wheat with enhanced resistance to leaf rust. *Plant Pathology.* 2006. 56: 46-54.

Keller B. and Feuillet C. Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Sci.* 2000. 5(6): 246-51. Review.

Kempin S.A., Liljegren S.J., Block L.M., Rounsley S.D., Yanofsky M.F. and Lam E. Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature.* 1997. 389: 802-803.

Kleinhofs A. and Smith S.A. Effects of excision repair on azide-induced mutagenesis. *Mutat. Res.* 1976. 41: 233-240.

Kleinhofs A., Owais W.M. and Nilan R.A. Azide. *Mutation Research.* 1978. 55: 165-195.

Kobayashi A., Takahashi A., Kakimoto Y., Miyazawa Y., Fujii N., Higashitani A. and Takahashi H. A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(11): 4724-4729.

Kolesnik T., Szeverenyi I., Bachmann D., Kumar C.S., Jiang S., Ramamoorthy R., Cai M., Ma Z.G., Sundaresan V. and Ramachandran S. Establishin an efficient Ac/Ds tagging system in rice: Lage-scale analisys of Ds flanking sequences. *Plant J.* 2004. 37: 301-314.

Konzak C.F. Mutations and Mutation Breeding. In Heyne E. G. (eds.). *Wheat and wheat improvement.* 2nd edition. 1987. 428-443.

Koornneef M. Classical mutagenesis in higher plants. In Gilmartin P. M. and Bowler C. (eds.), *Molecular Plant Biology*. 2002. 1: 1-11.

Koornneef M., Hanhart C.J., and Thiel F. A genetic and phenotypic description of *eceriferum* (*cer*) mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* 80. 1989. 118-122.

Koornneef M., Alonso-Blanco C. and Vreugdenhil D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol.* 2004. 55: 141-172. Review.

Komatsuda T., Pourkheirandish M., He C., Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundqvist U., Fujimura T., Matsuoka M., Matsumoto T. and Yano M. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007. 104(4): 1424-1429.

Konishi M. and Sugiyama M. A novel plant-specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1, is required for the maintenance of active cell proliferation. *Plant Physiol.* 2006. 140 (2): 591-602.

Konieczny A. and Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 1993. 4(2): 403-410.

Koprek T., McElroy D., Louwerse J., Williams-Carrier R. and Lemaux P.G. An efficient method for dispersing Ds elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J.* 2000. 24: 253-263.

Krysan P.J., Young J.C. and Sussman M.R. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1999. 11: 2283-2290.

Kumar A. and Bennetzen J.L. Plant retrotransposon. *Ann.Rev.Gen.* 1999. 33: 479-532.

Kwasniewski M. and Szarejko I. Molecular cloning and characterization of beta-expansin gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiol.* 2006. 141(3): 1149-1158.

- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. and Thornton J.M.** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993. 26: 283-291
- Lehmann L., Hagberg P. and Hagberg G.** Translocations in sodium azide treated material. *Barley Genetics Newsletter.* 1977. 7: 43.
- Li X., Song Y., Century K., Straight S., Ronald P., Dong X., Lassner M. and Zhang Y.** A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.* 2001. 27(3): 235-242.
- Li X., Lassner M. and Zhang Y.** Deleteagene: a fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants. *Comp Funct Genomics.* 2002. 3(2):158-160.
- Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D. and Drews G.N.** Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. 102(6): 2232-2237.
- Long S.R.** Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell.*1996. 8: 1885-1898.
- Lorrain S., Vaillau F., Balague C. and Roby D.** Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 2003. 8: 263-271.
- Lundqvist U., Franckowiak J., Konishi T.** New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genet. Newsl.* 1997. 26: 22.
- Lundqvist U.** The Swedish collection of barley mutants held at the Nordic Genebank. *Barley Genet Newsl.* 2005. 35: 150-154.
- Lynch M.** The origins of genome architecture. 2007. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Mackey J.** Mutation breeding in Europe. *Brookhaven Symposia in Biology.* 1965. 9: 141-156.
- Maes T., De Keukeleire P. And Gerats. T.** Plant tagnology. *Trens in Plant Science.* 1999. 4: 90-96.

Massa G.D. and Gilroy S. Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2003. 33(3): 435-445.

McCallum C.M., Comai L., Greene E.A. and Henikoff S. Targeting Induced Local Lesion IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 2000. 123: 439-442.

Manosalva P., Ryba-White M., Wu C., Lei C., Baraoidan M., Leung H. and Leach J. A PCR-based screening strategy for detecting deletions in defense response genes in rice. *Phytopathology.* 2003. 93: S57

McClintock B. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics.* 1953. 38(6): 579-599.

McNevin J.P., Woodward W., Hannoufa A., Feldmann K.A. and Lemieux B. Isolation and characterization of eceriferum (cer) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome.* 1993. 36: 610-618.

Mengiste T. and Paszkowski J. Prospects for the precise engineering of plant genomes by homologous recombination. *Biol Chem.* 1999. 380(7-8): 749-758. Review.

Micke A. and Donini B. Use of induced mutations for the improvement of seed propagated crops. In: *Induced variability in plant breeding. Proc. intern. Symp. of Section on Mutation and Polyploidy of the European Assoc. for Research on Plant Breeding, EUCAR PIA, Wageningen.* 1982. 2-9.

Mouchel C.F., Briggs G.C. and Hardtke C.S. Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev.* 2004. 18(6): 700-714.

Mouchel C.F., Osmont K.S. and Hardtke C.S. BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature.* 2006. 443(7110): 458-461.

Molina-Cano J.L., Moralejo M.A., Igartua E. and Romagosa I. Further evidence supporting morocco as a centre of origin of barley. *Theor. Appl. Genet.* 1999. 98(6/7): 913-918.

Muller H.J. Artificial transmutation of the gene. *Science.* 1927. 66: 84-87

Napoli C., Lemieux C., and Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990. 2: 279-289.

Nawrot M., Szarejko I. and Maluszynski M. Barley mutants with short roots. *Barley Genet. Newsl.* 2005. 35: 3-8

Neff M.M., Turk E. and Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 2002. 18: 613-615.

Nevo E. Origin, evolution, population genetics and resource for breeding of wilde barley, *H. spontaneum* in the Fertile Crescent. In: Shewry P.R. (eds.) *Barley genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology.* Wallingford, UK: CAB International. 1992. 19-43.

Ng P.C. and Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research.* 2003. 31: 3812-3814.

Ng M. and Yanofsky M.F. Three ways to learn the ABCs. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2000. 3(1): 47-52. Review.

Nieto C., Piron F., Dalmais M., Marco C. F., Moriones E., Gómez-Guillamón M. L., Truniger V., Gómez P., Garcia-Mas J., Aranda M.A. and Bendahmane A. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon *eIF4E*, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology.* 2007. 7: 34.

Nilan R.A., Kleinhofs A. and Sander C. Azide mutagenesis in barley. In Gaul H. (eds.), *Barley genetics III, Proc. 3rd Int. Barley Genet. Symp., Munich.* 1976. 113-122.

Nilan R.A., Sideris E.G., Kleinhofs A., Sander C. and Konzak C.F. Azide - a potent mutagen. *Mutat. Res.* 1973. 17: 142-144.

Notredame C., Higgins D., and Heringa J. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 2000. 302: 205-217.

Ochoa I.E., Blair M.W. and Lynch J.P. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science.* 2006. 46(4): 1609-1621.

Oleykowski C.A., Mullins C.R.B., Godwin A.K. and Yeung A.T. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26: 4597-4602.

Olsen O., Wang X., von Wettstein D. Sodium azide mutagenesis: Preferential generation of AT/GC transition in the barley Ant18 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90: 8043-8047.

Ortega D., Raynal M., Laudie M., Llauro C., Cooke R., Devic M., Genestier S., Picard G., Abad P., Contard P., Sarrobert C., Nussaume L., Bechtold N., Horlow C., Pelletier G. and Delseny M. Flanking sequence tags in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines: a pilot study. *C R Biol.* 2002. 325(7): 773-780.

Owais W.M., Rosichan J.L., Ronald R.C., Kleinhofs A. and Nilan R.A. A mutagenic metabolite synthesized by *Salmonella Typhimurium* grown in the presence of azide is azidoalanine. *Mutat. Res.* 1983. 118: 229-239.

Panstruga R., Büschges R., Piffanelli P. and Schulze-Lefert P. A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26(4): 1056-1062.

Parinov S., Sevugan M., Ye D., Yang W.C., Kumaran M. and Sundaresan V. Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1999. 11: 2263-2270.

Parinov S. and Sundaresan V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr. Op. Plant Bio.* 2000. 11: 157-161.

Perry J.A., Wang T.L., Tracey J.W., Gardner S., Pike J.M., Yoshida S. and Parniske M. A TILLING reverse genetics tool and a Web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2003. 131: 866-871.

Paterson A.H., Chapman B.A., Kissinger J.C., Bowers J.E., Feltus F.A. and Estill, J.C. Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces* and *Tetraodon*. *Trends in Genetics.* 2006. 22: 597-602.

Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A.K., Chapman J., Feltus F.A., Gowik U., Grigoriev I.V., Lyons E., Maher C.A., Martis M., Narechania A., Otiillar R.P., Penning B.W., Salamov A.A., Wang Y., Zhang L., Carpita N.C., Freeling M., Gingle A.R., Hash C.T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M.C., Ming R., Peterson D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K.F., Messing J. and Rokhsar D.S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature.* 2009. 457(7229): 551-556.

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. and Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding.* 1996. 2: 225-238.

Powell W., Thomas W. T.B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J.W. and Waugh R. Analysis of quantitative trait in barley by the use of Amplified Fragment Length polymorphism. *Heredity.* 1997. 79: 48-59.

Price A.H. and Tomos A.D. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L). 2. mapping quantitative trait loci using molecular markers, *Theor. Appl. Genet.* 1997. 95: 143-152.

Price A.H., Cairns J.E., Horton P., Jones H.G. and Griffiths H. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach:

Progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J. Exp. Bot.* 2002. 53(371): 989-1004.

Prina A.R. and Favret E.A. Influence of potassium cyanide on the azide mutagenesis in barley. *Hereditas.* 1983. 98: 253-258.

Prina A.R., Hagberg G. and Hagberg A. Reciprocal translocations in sodium azide treatments in barley. *Barl. Genet. Newsl.* 1983. 13: 72-78.

Qiu P., Shandilya H., D'Alessio J.M., O'Connor K., Durocher J. and Gerard G.F. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques.* 2004. 36: 702-707.

Robertson D. VIGS vector for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant. Bol.* 2004. 55: 495-519.

Rock C.D. and Ng P.P.F. Dominant Wilty mutants of *Zea mays* (*Poaceae*) are not impaired in abscisic acid perception or metabolism. *American Journal of Botany.* 1999. 86: 1796-1800.

Rostoks N., Schmierer D., Mudie S., Drader T., Brueggeman R., Caldwell D.G., Waugh R. and Kleinhofs A. Barley necrotic locus *nec1* encodes the cyclic nucleotide-gated ion channel 4 homologous to the Arabidopsis *HLM1*. *Mol Genet Genomics.* 2006. 275(2): 159-168.

Ryu C.H., You J.H., Kang H.G., Hur J., Kim Y.H., Han M.J., An K., Chung B.C., Lee C.H. and An G. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. *Plant. Mol. Biol.* 2004. 54: 489-502.

Sali A. and Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993. 234: 779-815.

Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bes M., Piffanelli P., Piegu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Perin C., Sabau X., Ghesquiere A., Glaszmann J.C., Delseny M., Guiderdoni E. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J.* 2004. 39: 450-464.

Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B., Rueb S., Delseny M., Guiderdoni E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* 2003. 106: 1396-1408.

Sappl P.G., Carroll A.J., Clifton R., Lister R., Whelan J., Harvey Millar A. and Singh K.B. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 2009. in press.

Sampedro J. and Cosgrove D.J. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 2005. 6(12): 242.1-242.11. Review.

Sanchez R. and Sali A. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95: 13597-13602

Sander C. and Nilan R.A. Increasing the mutagenic efficiency of sodium azide in barley. *Barl. Genet. Newsl.* 1974. 4: 63-65.

Schaefer D.G. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Cur.Op. Plant Biol.* 2001 4: 143-150.

Schmitz G. and Theres K. Genetic control of branching in Arabidopsis and tomato. *Curr Opin Plant Biol.* 1999. 2: 51-55

Shaked H., Melamed-Bessudo C. and Levy A.A. High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. 102: 12265–12269.

Scholz S., Lorz H. and Lutticke S. Transposition of the maize transposable element Ac in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol.Gen.Genet.* 2001. 264: 653-661.

Singh P.K., Gonzalez-Hernandez J.L., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M., Hughes G.R. Identification and molecular mapping of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3 in tetraploid wheat. *Phytopathology.* 2006. 96(8):885-889.

Slade A.J., Fuerstenberg S.I., Loeffler D., Steine M.N. and Facciotti D., A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology*. 2005. 23: 75-81

Smith V., Chou K.N., Lashkari D., Botstein D., Brown P.O. Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science*. 1996. 274(5295): 2069-2074.

Sood R., English M.A., Jones M., Mullikin J., Wang D.M., Anderson M., Wu D., Chandrasekharappa S.C., Yu J., Zhang J. and Paul L.P. Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods*. 2006. 39: 220-227.

Spence R.K. The influence of sodium azide on the biological effects of ionizing radiation in moist barley seeds. M. S. Thesis. Washington State Univ. Pullman, Wash. Spencer. 1965. W.P. 19

Speulman E., Metz P.L., van Arkel G., te Lintel Hekkert B., Stiekema W.J. and Pereira A. A two-component enhancer inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the Arabidopsis genome. *Plant Cell*. 1999. 11: 1853-1866.

Stadler J.L. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*. 1928. 68: 186-187.

Stadler J.L. Genetic Effects of X-Rays in maize. *PNAS*. 1928. 14: 69-75

Steele K.A., Price A.H., Shashidhar H.E. and Witcombe J.R. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theor. App. Gen.* 2006. 112(2): 208-221.

Stemple D.L. TILLING--a high-throughput harvest for functional genomics. *Nat Rev Genet*. 2004 5(2): 145-150. Review.

Szarejko I., Janiak A., Chmielewska B. and Nawrot M. Genetic analysis of several root hair mutants of barley. *Barl. Genet. Newsl.* 2005. 35: 36-38

Tagliani L., Nissen S. and Blake T.K. Comparison of growth, exogenous auxin sensitivity, and endogenous indole-3-acetic acid content in roots of *Hordeum vulgare* L. and an agravitropic mutant. *Biochem Genet.* 1986. 24(11-12): 839-848.

Talamè V., Bovina R., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Lundqvist U. and Salvi S. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol J.* 2008 6(5): 477-485

Terada R., Urawa H., Inagaki Y., Tsugane K. and Iida S. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnol.* 2002. 20: 1030-1034.

Terada R., Johzuka-Hisatomi Y., Saitoh M., Asao H. and Iida S. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol.* 2007 144(2): 846-856.

Taylor N.E. and Greene E.A. PARSESNP: A tool for the analysis of nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2003. 31(13): 3808-3811.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 2000. 408: 796-815.

Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Young K., Taylor N.E., Henikoff J.G., Comai L. and Henikoff S. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Gen.Res.* 2003. 13: 524-530.

Till B.J., Reynolds S.H., Weil C., Springer N., Burtner C., Young K., Bowers E., Codomo C.A., Enns L.C., Odden A.R., Greene E.A., Comai L. and Henikoff S. Discovery of induced mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol.* 2004. 28: 4-12.

Till B. J., Zerr T., Comai L. and Henikoff, S. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols.* 2006a 1: 2465-2477.

Till B.J., Zerr T., Bowers E., Greene E.A., Comai L. and Henikoff S. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. *Nucleic Acids Research.* 2006b. 34: e99.

Till B.J., Cooper J, Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikoff S. and Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.* 2007. 11: 7-19.

Tissier A.F., Marillonnet S., Klimyuk V., Patel K., Torres M.A., Murphy G. and Jones J.D. Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertion in *Arabidopsis*. A tool for functional genomics. *Plant Cell.* 1999. 11: 1841-1852.

Toojinda T., Baird E., Booth A., Broers L., Hayes P., Powell W., Thomas W.T.B., Vivar H., Young G. Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. *Theoret. Appl. Genet.* 1998. 96: 123-131.

Tuberosa R. and Salvi S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci.* 2006. 11(8): 405-412. Review.

Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y.

and Rokhsar D. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 2006. 313: 1596-1604.

van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N. and Stuitje A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 1990. 2: 291-299.

Varshney R.K., Marcel T.C., Ramsay L., Russell J., Röder M.S., Stein N., Waugh R., Langridge P., Niks R.E. and Graner A. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor. Appl. Genet.* 2007. 114(6):1091-1103.

Veleminsky J. and Angelis K.J. Effects of sodium azide on replicative and repair DNA synthesis in barley embryos. *Mutat. Res.* 1987a. 190: 125-129.

Veleminsky K., Rosichan J.L., Kleinhofs A. and Nilan R.A. Interaction of the mutagenic metabolite of sodium azide, synthesized in vitro, with DNA of barley embryos. *Mutat. Res.* 1987b. 181: 73-79.

Wang N., Wang Y., Tian F., King G.J., Zhang C., Long Y., Shi L. and Meng J. A functional genomics resource for *Brassica napus*: development of an EMS mutagenized population and discovery of FAE1 point mutations by TILLING. *New Phytol.* 2008. 180(4): 751-765.

Ward F.D. The production of mutations in *Drosophila melanogaster* by irradiation with alpha-rays. *Genetics*. 1934. 20(3): 230-249.

Waterhouse P.M. and Helliwell C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2003. 4(1): 29-38. Review.

Wen T.J. and Schnable P.S. Analyses of mutants of three genes that influence root hair development in *Zea mays* (*Gramineae*) suggest that root hairs are dispensable. *Am. J. Bot.* 1994. 81: 833-843.

Wenzl P., Li H., Carling J., Zhou M., Raman H., Paul E., Hearnden P., Maier C., Xia L., Caig V., Ovesná J., Cakir M., Poulsen D., Wang J., Raman R., Smith K.P., Muehlbauer G.J., Chalmers K.J., Kleinhofs A., Huttner E. and Kilian A. A

high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics*. 2006. 7: 206.

Wienholds E., van Eeden F., Kusters M., Mudde J., Plasterk R.H. and Cuppen E. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Research*. 2003. 13: 2700-2707.

Winkler S., Schwabedissen A., Backasch D., Bökel C., Seidel C., Bönisch S., Fürthauer M., Kuhrs A., Cobreros L., Brand M. and González-Gaitán M. Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Research*. 2004. 15: 718-723.

Wing R., Muehlbauer G.J., Close T.J., Kleinhofs A., Wise R., Heinen S., Begum D., Frisch D., Yu Y., Henry D., Palmer M., Rambo T., Simmons J., Fenton R.D., Malatrasi M., Choi D.W., Oates R., Main D. Development of a genetically and physically anchored EST resource for barley genomics: Fusarium infected Morex spike cDNA library. 2001. Unpublished.

Woll K., Borsuk L.A., Stransky H., Nettleton D., Schnable P.S. and Hochholdinger F. Isolation, characterization, and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant *rum1*. *Plant Physiol*. 2005. 139: 1255-1267.

Wolter M., Hollricher K., Salamini F. and Schulze Lefert P. The mlo resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet*. 1993. 239: 122-128

Wu G.Z., Shi Q.M., Niu Y., Xing M.Q. and Xue H.W. Shanghai RAPESEED Database: a resource for functional genomics studies of seed development and fatty acid metabolism of Brassica. *Nucleic Acids Research*. 2007. 36: 1044-1047.

Yamagata H. Fruits and perspectives of mutation breeding. *Gamma Field Symposia*. Inst. of Radiation Breeding, NIAR, MAFF, Japan. 1981. 11-40.

Yang B., Wen X., Kodali N.S., Oleykowski C.A., Miller C.G., Kulinski J., Besack D., Yeung J. A., Kowalski D. and Yeung A.T. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry*. 2000. 39: 3533-3541.

Yao S.G., Taketa S. and Ichii M. A novel short-root gene that affects specifically early root development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 2002. 163(2): 207-215.

Yao S.G., Taketa S. and Ichii M. Isolation and characterization of an abscisic acid-insensitive mutation that affects specifically primary root elongation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 2003. 164(6): 971-978.

Yennawar N.H., Li L.C., Dudzinski D.M., Tabuchi A., and Cosgrove D.J. Crystal structure and activities of *EXPB1* (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2006. 103: 14664-14671.

Yu Y., Tomkins J.P., Waugh R., Frisch D.A., Kudrna D., Kleinhofs A., Brueggeman R.S., Muehlbauer G.J., Wise R.P. and Wing R.A. A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor. and Appl. Genet.* 2000. 101: 1093-1099.

Zhang Y., Tessaro M.J., Lassner M. and Li X. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 2003. 15(11): 2647-2653.

Zierold U., Scholz U. and Schweizer P. Transcriptome analysis of mlo-mediated resistance in the epidermis of barley. *Mol. Plant Pathol.* 2005. 6(2): 139-151.

TABELLE

Tabella 1. Categorie fenotipiche in cui sono state raggruppate le famiglie mutanti M₃. Per ogni categoria è riportato il numero dei mutanti (una famiglia può comparire in più categorie fenotipiche se presenta più di una alterazione), la percentuale rispetto al totale dei mutanti e la percentuale rispetto al totale delle famiglie nella popolazione TILLMore.

<i>Categoria fenotipica</i>	<i>Mutanti (N°)</i>	<i>N° famiglie mutanti/ N° totale famiglie mutanti (%)</i>	<i>N° famiglie mutanti/ N° totale famiglie totali popolazione (%)</i>
Colore della pianta	598	27,3	12,2
Cerosità superficie	129	5,9	2,6
Accestimento	48	2,2	1,0
Epoca di spigatura	205	9,4	4,2
Morfologia foglia	110	5,0	2,2
Altezza della pianta	341	15,6	7,0
Habitus	111	5,1	2,3
Morfologia pianta	73	3,3	1,5
Necrosi fogliare	121	5,5	2,5
Aspetto della spiga	452	20,7	9,2
TOTALE	2188	100,0	44,7

Tabella 2. Elenco dei mutanti più interessanti per la morfologia della spiga. La nomenclatura utilizzata per la classificazione dei mutanti è la stessa impiegata dalla Dr.ssa Udda Lundqvist per la collezione di mutanti della Nordic Gene Bank (Lundqvist, 2005). Per ogni classe fenotipica è riportata (a destra) una breve descrizione del fenotipo osservato.

<i>MUTANTE</i>	<i>FENOTIPO</i>
Irregular Spike	Spiga irregolare e/o deforme
Breviaristatum	Reste corte
Laxatum	Spiga dilatata
Erectoides	Spiga compatta
Curly awns	Reste arricciate
Wilting awns	Reste arrotolate
Long awns	Reste lunghe
Long shaped grains	Cariossidi allungate
Short spike	Minore numero di internodi nella spiga
Eburatum (oAlbinolemma)	Parte basale della lemma bianca
Long spike	Elevato numero di cariossidi
Upper half spike sterile	Apice della spiga sterile e non del tutto sviluppata
Narrow spike	Cariossidi assotigliate
Elongated glumes	Glume molto sviluppate
Yellow awns	Reste gialle
Hanging spike	Ultimo internodo ripiegato verso il basso
Necrotic lemma	Parte basale della lemma necrotica
Red Awns	Parte terminale delle reste rosse
Awnless	Spiga priva di reste
Elongated basal rachis internode	Ultimo internodo della spiga allungato
Extralemma	Spiga con lemma supplementare
Naked seed	Cariosside nuda (senza lemma e palea)

Tabella 3. Elenco delle categorie fenotipiche in cui sono state classificate le famiglie M₄ mutanti per l'apparato radicale. Per ogni classe è riportato il numero totale di mutanti individuati, la percentuale rispetto al totale dei mutanti e la percentuale rispetto ai 1.000 genotipi analizzati mediante approccio "paper-roll".

<i>Categoria fenotipica</i>	<i>Mutanti (N°)</i>	<i>N° famiglie mutanti/ N° totale famiglie mutanti (%)</i>	<i>N° famiglie mutanti/ N° totale famiglie totali popolazione (%)</i>
Radice corta	25	34,7	2,5
Radice molto corta	12	16,7	1,2
Radice corta e ispessita	16	22,2	1,6
Radice corta e arricciata	8	11,1	0,8
Radice arricciata	3	4,2	0,3
Radice geotropica	2	2,8	0,2
Assenza peli radicali	2	2,8	0,2
Peli radicali accorciati	2	2,8	0,2
Radici in foglie	2	2,8	0,2
TOTALE	72	100,0	7,2

Tabella 4. Descrizione dei mutanti per il gene *HvBRX1*. Nella prima colonna è stato riportato il codice delle famiglie mutanti identificate; di seguito, per ciascun mutante, è stato riportato l'effetto della mutazione a livello nucleotidico, la posizione della mutazione all'interno del gene e l'effetto a della mutazione a livello aminoacidico. Nell'ultima colonna è stata indicata la condizione genotipica della famiglia mutante (omozigote se la mutazione è completamente fissata ed eterozigote se la mutazione è ancora segregante all'interno della famiglia).

<i>Mutanti</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Posizione mutazione</i>	<i>Effetto della mutazione</i>	<i>PSSM</i>	<i>SIFT</i>	<i>Condizione genotipica</i>
64	G in A	Esone	Aspartato in Asparagina			Eterozigote
855	G in A	Introne				Omozigote
1220	C in T	Esone	Silente			Omozigote
2881	C in T	Esone	Silente			Eterozigote
2950	C in T	Esone	Serina in Fenilalanina			Eterozigote
4050	C in T	Introne				Omozigote
4305	G in A	Introne				Omozigote
5992	C in T	Introne				Eterozigote

Tabella 5. Descrizione dei mutanti per il gene *HvRPDI*. Nella prima colonna è stato riportato il codice delle famiglie mutanti identificate; di seguito, per ciascun mutante, è stato riportato l'effetto della mutazione a livello nucleotidico, la posizione della mutazione all'interno del gene e l'effetto a della mutazione a livello aminoacidico. Nell'ultima colonna è stata indicata la condizione genotipica della famiglia mutante (omozigote se la mutazione è completamente fissata ed eterozigote se la mutazione è ancora segregante all'interno della famiglia).

<i>Gene</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Posizione mutazione</i>	<i>Sostituzione aminoacidica</i>	<i>PSSM</i>	<i>SIFT</i>	<i>Condizione genotipica</i>
1627	C in T	Esome	Prolina in Serina			Eterozigote
253	G in A	Esome	Silente			Eterozigote
2393	G in A	Esome	Silente			Eterozigote
2686	C in T	Esome	Alanina in Valina			Omozigote
3699	G in A	Esome	Silente			Eterozigote
3869	G in A	Esome	Arginina in Glutammina			Eterozigote
4161	G in A	Esome	Valina in Metionina			Omozigote
4968	C in T	Esome	Silente			Omozigote
953	G in A	Esome	Silente			Omozigote

Tabella 6. Descrizione dei mutanti per il gene *HvEXPβ1*. Nella prima colonna è stato riportato il codice delle famiglie mutanti identificate; di seguito, per ciascun mutante, è stato riportato l'effetto della mutazione a livello nucleotidico, la posizione della mutazione all'interno del gene, l'effetto a della mutazione a livello aminoacidico e il punteggio PSSM e SIFT attribuito dal programma PARSESNP. Nell'ultima colonna è stata indicata la condizione genotipica della famiglia mutante.

<i>Gene</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Posizione mutazione</i>	<i>Sostituzione aminoacidica</i>	<i>PSSM</i>	<i>SIFT</i>	<i>Condizione genotipica</i>
4537	C in T	Esoni	Alanina in Valina			Eterozigote
934	G in A	Esoni	Glicina in Arginina	28.3	0.00	Eterozigote
85	G in A	Esoni	Alanina in Treonina	5.9	0.59	Omozigote
5085	G in A	Esoni	Silente			

Tabella 7. Descrizione dei mutanti per il gene *HvMIZ1*. Nella prima colonna è stato riportato il codice delle famiglie mutanti identificate; di seguito, per ciascun mutante, è stato riportato l'effetto della mutazione a livello nucleotidico, la posizione della mutazione all'interno del gene e l'effetto a della mutazione a livello aminoacidico. Nell'ultima colonna è stata indicata la condizione genotipica della famiglia mutante.

<i>Gene</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Posizione mutazione</i>	<i>Sostituzione aminoacidica</i>	<i>PSSM</i>	<i>SIFT</i>	<i>Condizione genotipica</i>
237	G in A	Esoni	Valina in Metionina			Eterozigote
286	G in A	Esoni	Triptofano in codone di stop			Eterozigote
769	G in T	Esoni	Valina in Leucina			Omozigote
2051	G in A	Esoni	Glicina in Glutammato			Eterozigote

Tabella 8. Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti mediante analisi molecolare della popolazione TILLMore. In tabella è stato riportato per ogni gene analizzato la dimensione dell'amplicone analizzato, il numero di mutazioni identificate suddivise per tipologia (non-senso, di-senso o silenti) e il numero totale delle mutazioni identificate. Utilizzando questi dati è possibile calcolare il valore della densità di mutazione pari ad una mutazione ogni 480 Kb analizzate.

<i>Gene</i>	<i>Dimensione amplicone</i>	<i>Mutazioni non-senso</i>	<i>Mutazioni di-senso</i>	<i>Mutazioni silenti e introniche</i>	<i>Totale</i>
<i>HvBRX1</i>	940 bp	-	2	6	8
<i>HvRPD1</i>	670 bp	-	4	5	9
<i>HvEXPβ1</i>	997 bp	-	3	1	4
<i>HvMIZ1</i>	580 bp	1	3	-	4
Totale	3.187 bp	1	12	12	25

Tabella 9. Confronto tra le risorse TILLING ottenute in altre specie da diversi gruppi di ricerca. Procedendo da destra verso sinistra ho riportato il nome del progetto di ricerca, la pubblicazione di riferimento, la specie oggetto di studio, le dimensioni della popolazione mutagenizzata, il numero dei geni analizzati (come riportato nella pubblicazione) e la densità di mutazione.

<i>Progetto di Ricerca</i>	<i>Articolo di riferimento</i>	<i>Specie</i>	<i>Dimensioni pop.</i>	<i>Geni analizzati</i>	<i>Densità di mutazione</i>
Arcadia bioscience	Slade <i>et al.</i> , 2005	<i>Triticum aestivum</i>	10.000	2	0,024
		<i>Triticum durum</i>	8.000	2	0,040
Canadian TILLING Initiative	Himmelblau <i>et al.</i> , 2009	<i>Brassica oleracea</i>	1.000	15	0,447
Lotus TILLING Project	Perry <i>et al.</i> , 2003	<i>Lotus japonicus</i>	3.700	1	0,047
Maize TILLIN Project	Till <i>et al.</i> , 2004	<i>Zea mays</i>	750	11	0,500
Rice TILLING Project	Till <i>et al.</i> , 2007	<i>Oryza sativa</i>	768	10	0,300
SCRI Barley mutants	Caldwell <i>et al.</i> , 2004	<i>Hordeum vulgare</i>	9.200	2	1,000
Seattle TILLING Project	Greene <i>et al.</i> , 2003	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.000	molti	0,170
Shangai RAPEDEES Database	Wang <i>et al.</i> , 2008	<i>Brassica napus</i>	1.400	4	0,085
Soybean Mutation Project	Cooper <i>et al.</i> , 2008	<i>Glycine max</i>		7	0,270
UTILLdb	Dalmais <i>et al.</i> , 2008	<i>Pisum sativum</i>	4.700	3	0,200
TILLMore		<i>Hordeum vulgare</i>	4.906	4	0,480

Tabella 10. Rapporti di segregazione osservati mediante analisi CAPS nelle famiglie M₃ dei mutanti di-senso ai geni *HvBRX1* e *HvEXPβ1*.

<i>Mutante</i>	<i>EdR</i>	<i>Piante mutanti</i>	<i>Piante wild-type</i>	<i>Piante eterozigoti</i>	<i>Totale</i>	<i>Valore χ²</i>	<i>Prob.</i>
<i>HvBRX1</i>							
64	<i>MnlI</i>	10	2	18	30	5,5	0.065002
2950	<i>MboI</i>	5	6	16	27	1	0.606531
<i>HvEXPβ1</i>							
934	<i>BciIV</i>	7	6	17	30	0,6	0,740818
4537	<i>HaeII</i>	9	8	13	30	0,6	0,740818

FIGURE



Figura 1. Nelle foto è visibile una porzione delle famiglie M_3 allevate in campo presso i campi sperimentali dell'Università di Bologna di Cadriano. Foto (a) e (b): disposizione a postarella delle 4.900 famiglie M_3 durante le prime fasi di crescita. Foto (c): classificazione dei mutanti morfologici in fase di fioritura/spigatura in collaborazione con la Dott.ssa Udda Lundquist.

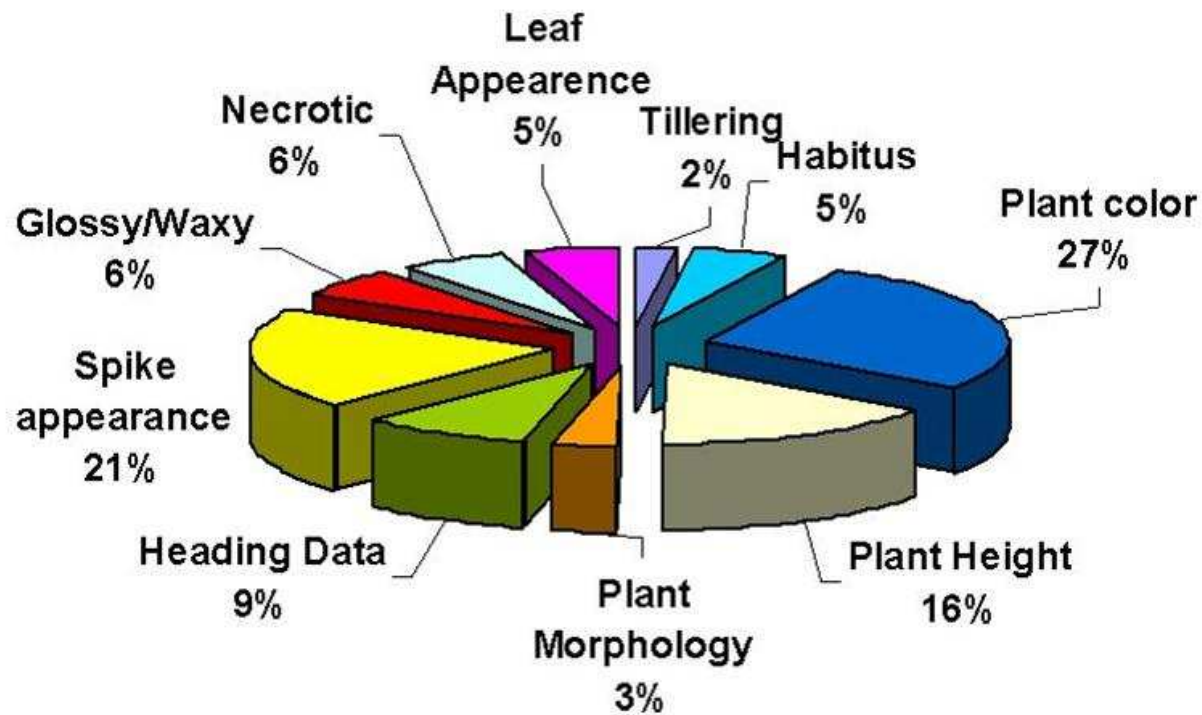


Figura 2. Diagramma riassuntivo delle varianti fenotipiche osservate nella popolazione TILLMore in generazione M_3 . Nel diagramma circolare sono riportate le dieci categorie morfologiche in cui sono stati catalogati tutti i mutanti fenotipici: cerosità della superficie, portamento/habitus, data di spigatura, morfologia della foglia, necrosi della foglia, accestimento, colore della pianta, altezza, morfologia della pianta e morfologia della spiga. Il colore della pianta e la morfologia della spiga sono le due categorie maggiormente rappresentate ed insieme raggiungono quasi il 50% delle varianti osservate.



Figura 3. Alcuni esempi di mutanti per il colore della pianta a confronto con Morex non trattato: (a) mutante *white striped* (cod. pianta 1634) con striature di colore bianco su tutti gli organi della pianta; (b) mutante *chlorina* (cod. pianta 1640) con colorazione giallo-verde; (c) mutante *mottled* (cod. pianta 2390) con chiazze di colore biancastre a livello dei tessuti fogliari.



Figura 4. Alcuni esempi di mutanti per la cerosità della superficie. A sinistra un mutante con alto contenuto di cere nel culmo (mutante *wax-coated*; codice 4977). A destra un mutante a basso contenuto di cere (mutante *glossy*; codice 5281).



Figura 5. Alcuni esempi di mutanti per il portamento della pianta: mutante *brachitic* (cod. pianta 1212) con portamento rigido, seminano ad internodi accorciati; mutante *bushy* (cod. pianta 4410) con numero moto elevato di culmi di accestimento e portamento a cespuglio; mutante *prostrated* (cod. pianta 2441) con culmi che crescono aderenti al terreno.

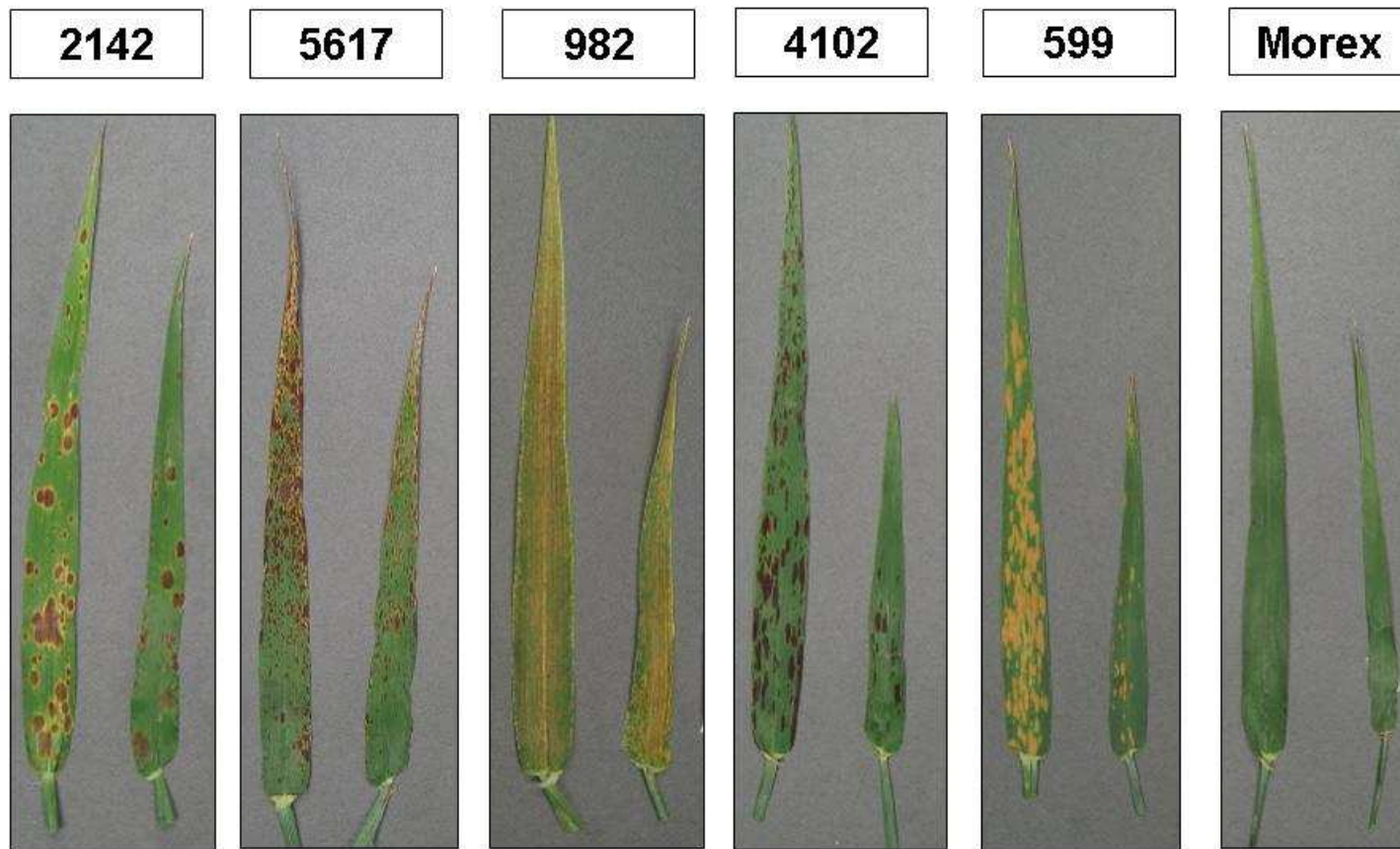


Figura 6. Alcuni esempi di mutanti necrotici. Per ogni mutante identificato è stata fotografata la terzultima foglia emessa (a sinistra) e la foglia bandiera (a destra). A destra la foto del genotipo selvatico (Morex non trattato) utilizzato come controllo di riferimento.



Figura 7. Alcuni esempi di mutanti per la morfologia della spiga. Da sinistra verso destra sono visibili rispettivamente un mutante *short spike* (5765), un mutante *irregular spike* (3673), un mutante *albinolemma* (1195), un mutante *awnless* (5309), e un mutante *calcaroides* (4428). A destra la foto del genotipo selvatico (Morex non trattato) utilizzato come controllo di riferimento.

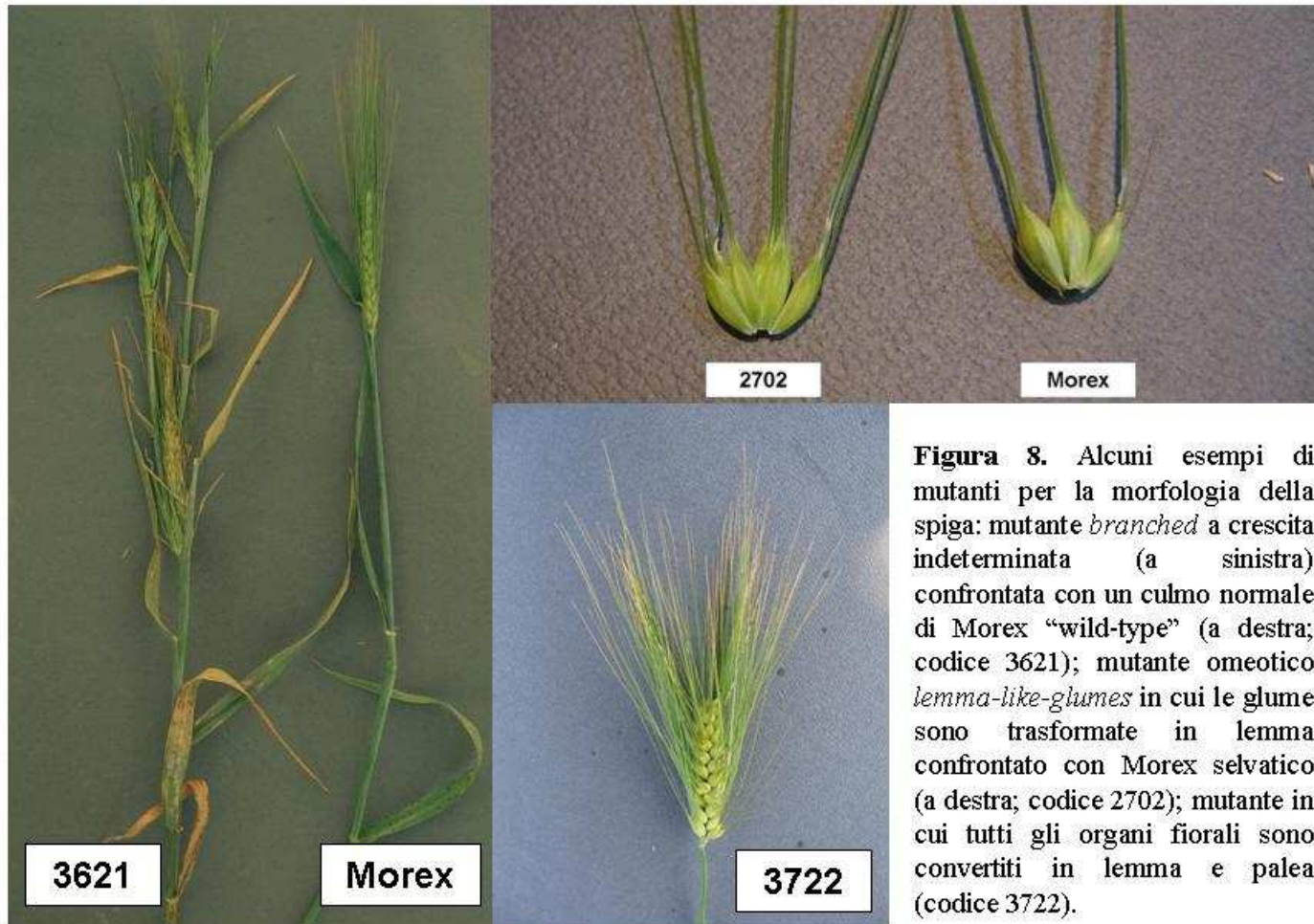


Figura 8. Alcuni esempi di mutanti per la morfologia della spiga: mutante *branched* a crescita indeterminata (a sinistra) confrontata con un culmo normale di Morex “wild-type” (a destra; codice 3621); mutante omeotico *lemma-like-glumes* in cui le glume sono trasformate in lemma confrontato con Morex selvatico (a destra; codice 2702); mutante in cui tutti gli organi fiorali sono convertiti in lemma e palea (codice 3722).

The screenshot shows the TILLMore website interface. The main heading is "TILLMore: a TILLING resource in Barley Morex". Below this, there is a navigation menu on the left with links like "Home", "What is TILLMore", "How-to-TILL genes at TILLMore", "TILLMore Barley Mutants Database", "Biblio", "Links", "Funding and acknowledgements", and "Contacts and people". The main content area is titled "TILLMore Barley Mutants database - advanced search". It features two search methods: "Search for text" (labeled A) and "Search for code" (labeled B). The "Search for code" section includes a "List of values" dropdown menu with categories like "Plant color", "Plant morphology/habitus", "Tillering", "Leaf appearance", "Plant height", "Glossy/Surface wax", "Necroticans", "Heading date", "Spike morphology", "Floret appearance", and "Root morphology". Below this, there are two sections: "Floret appearance" and "Root morphology", each with a list of traits and a search button. To the right, a box displays search results for "Infertile terminal spikelets", listing codes 5008, 5046, 5062, and 5295 with their respective plant characteristics. A text box at the bottom right states: "Il database di mutanti è disponibile al sito: www.distagenomics.unibo.it".

Figura 9. In figura è riportata la pagina web della banca dati di mutanti TILLMore. La ricerca dei mutanti di interesse può essere effettuata con due strategie: A) Genetica inversa: è possibile effettuare una ricerca partendo dal codice della pianta mutante identificata mediante analisi molecolare. Il programma fornisce informazioni relative alle alterazioni fenotipiche del mutante corrispondente; B) Genetica diretta: vengono elencati i codici di tutte le linee della popolazione TILLMore che mostrano una alterazione morfologica di interesse. L'indagine può essere effettuata per parole chiave (funzione "search for text") o mediante ricerca per categoria (funzione "category list")

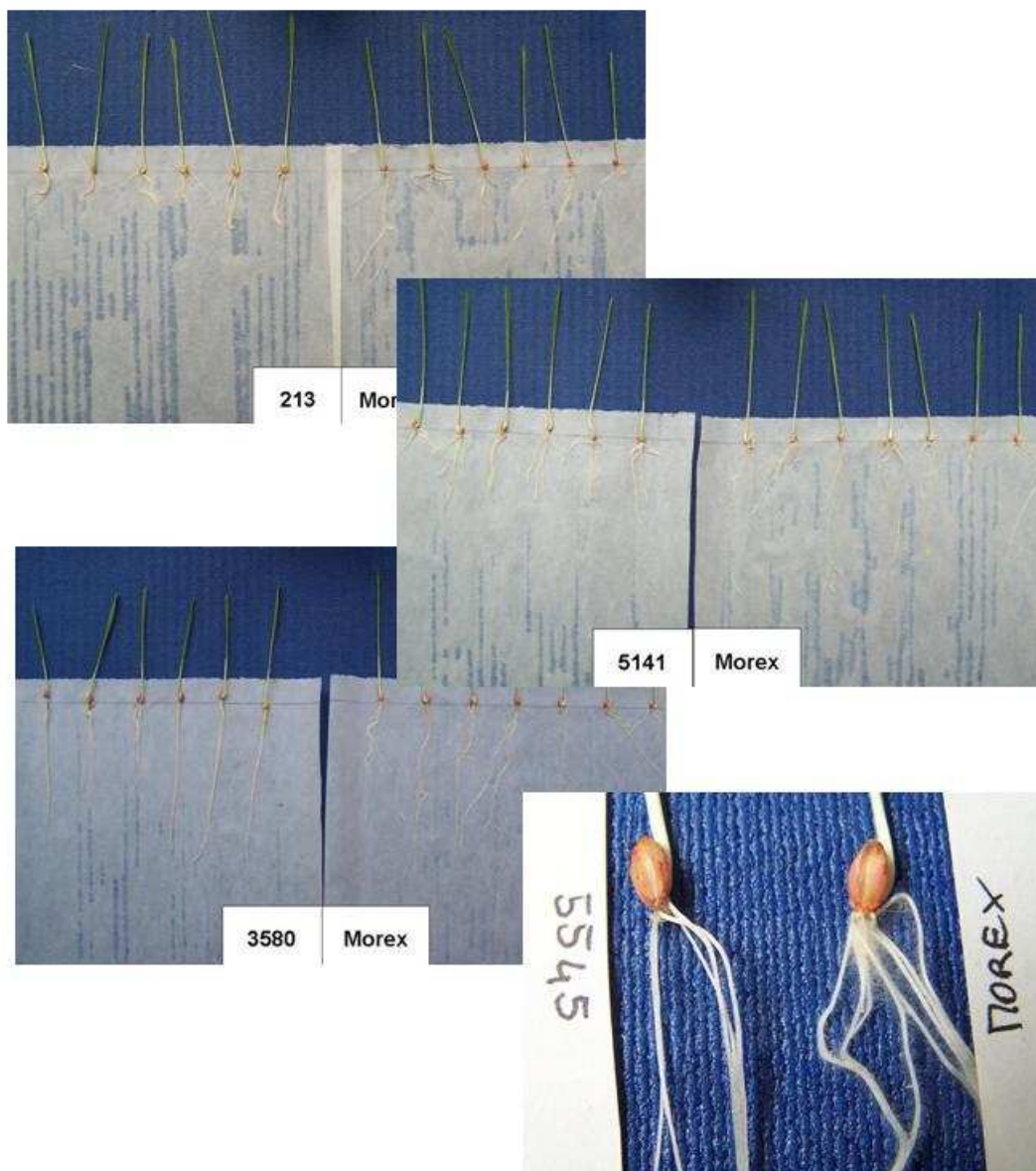


Figura 10. Alcuni esempi di mutanti radicali identificati mediante strategia “paper-roll”: mutante *very short root* (cod. 213); mutante *short and thick root* (cod. 5141) con radice accorciata e spessa; mutante *highly-geotropic* (cod. 3580) con accentuato geotropismo radicale e mutante *hairless* (cod. 5545) privo peli radicali. In ogni foto è presente sulla destra un controllo fenotipico (Morex “wild-type”).

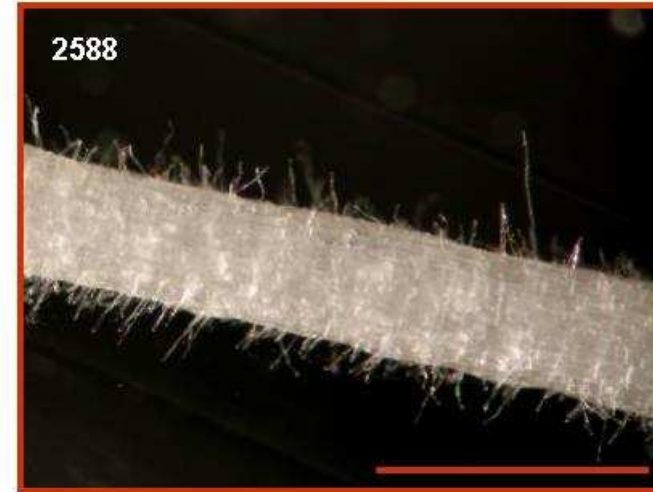
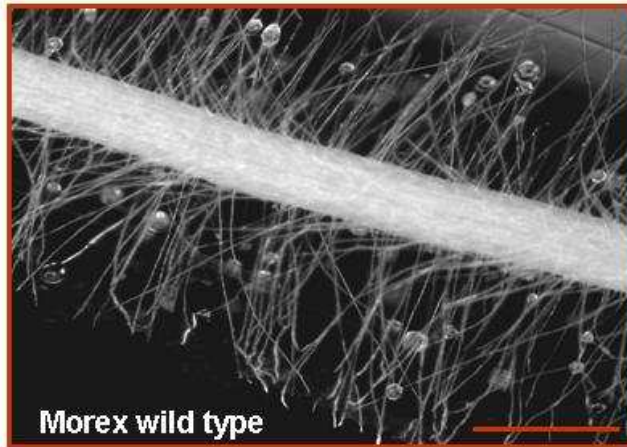


Figura 11. Immagini di due mutanti per i peli radicali ottenute allo stereomicroscopio. In alto a destra un mutante *short root hairs* (cod. 2588) con peli radicali di lunghezza molto ridotta. In basso un mutante *hairless* (cod. 5545) con peli radicali completamente assenti. In alto a sinistra i peli radicali del genotipo “wild-type” (Morex) utilizzato come controllo.

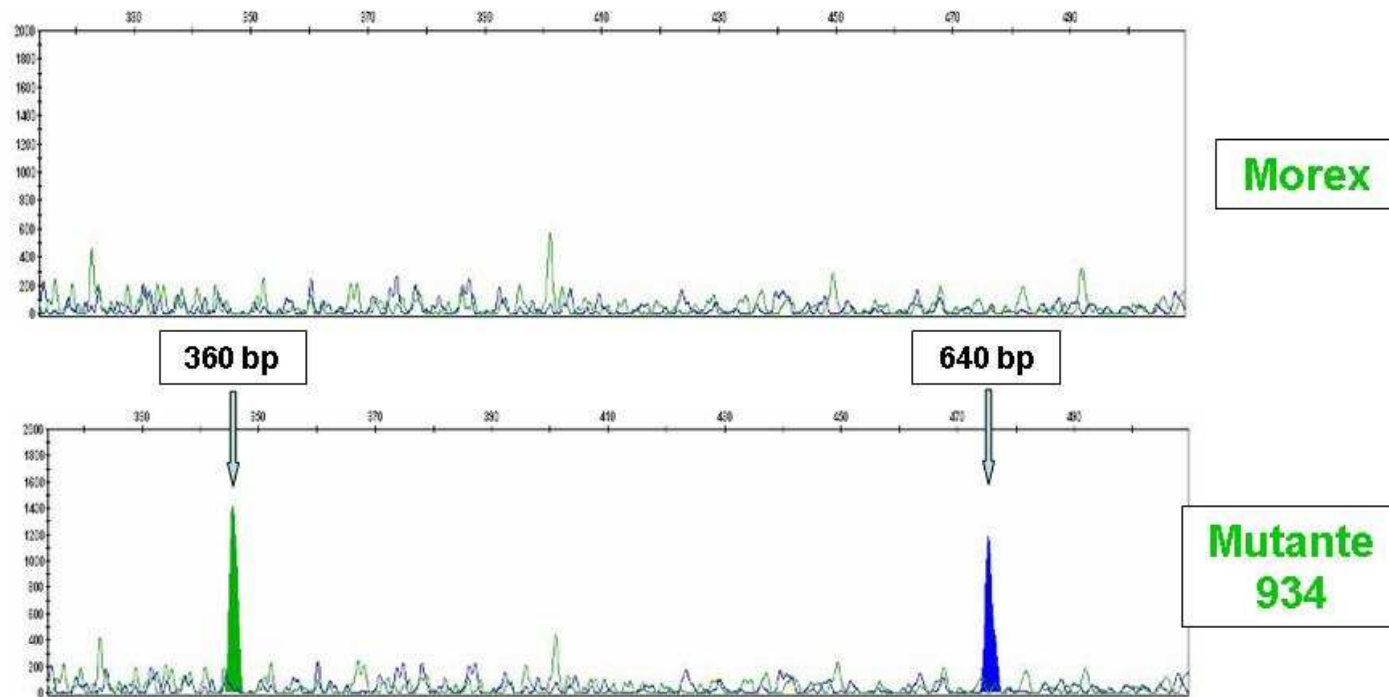


Figura 12. Immagine della corsa elettroforetica in due capillari condotta con il sequenziatore ABI3730. In alto è riportata l'immagine di una corsa con Morex "wild-type" mentre in basso l'immagine di una corsa con il "campione pool" contenente il mutante 934 del gene *HvEXPβ1*. Per il "campione pool" sono evidenti due picchi aggiuntivi che corrispondono ai due frammenti ottenuti in seguito al taglio molecolare con l'enzima *CelI*. Ciascun frammento è coniugato con una molecola fluorescente differente (FAM e VIC) e quindi in corsa elettroforetica sono visualizzati come due picchi di diverso colore. La somma in lunghezza dei due frammenti di 360 bp e 640 bp corrisponde alla lunghezza complessiva dell'amplificato di ca. 980 bp. Nel campione di controllo (Morex "wild-type") non è presente nessun picco poiché non è avvenuto alcun taglio enzimatico.

```

AtBRX   : --VVLDDDG-PKEWMAQVEPGVHITFASLPTG-GNDLKRIRFSREMFDKWQAQRWUWGENYDKIVELYNVQRFNRC--ALQTPAR : 208
AtBRX1  : --VVLEDDDE-PKEWMAQVEPGVHITFVSLPSG-GNDLKRIRFSREVFDKWQAQRWUWGENYDRIVELYNVQRFNRC--ALQTPGR : 206
OsBRX1  : -----SEDDEAKENVAQVEPGVLTITFLSLPEG-GNDLKRIRFSREIFNKWQAQRWUWGENYDKVMELYNVQRFNRCCT-PLPPTPK : 220
OsBRXL2 : ETVLLEEDRVPRENTAQVEPGVQITFVSIPIGGAGNDLKRIRFSREMFNKWEAQRWUWGENYDRVVELYVQTFSRQO-GFSTPTS : 232
64      : -----QRWUWGENYDKVMELYNVVHRFNFHCSVPLPTTAR : 32
2950   : -----QRWUWGENYDKVMELYNVVHRFNFHCSVPLPTTAR : 32

          260      *          280      *          300      *          320      *
AtBRX   : SDDQS-QRD-STYSKMDSAES-----VDLTPR-H-NF-----RPP-G--SVP---HHFYG : 249
AtBRX1  : SEDQS-QRD-STYTRIDSAES-----RDLTQRDN-NF-----RPP-G-GVVP---HHFYG : 249
OsBRX1  : SEDESLEKEDIPTPPLMSERLPHTLHRSLTGGRTTGIGQPSLGHQHNLGNHGRQOHHHCYTGHCQYGSVGLASTPKLSSISGA : 304
OsBRXL2 : SVDEANQRD--FYSRVGSITRESPAMMPPPPPLPSSGAGREH-PISRTASSKALSSSSVAAARPPFYPS-TAVPDPDHVVA : 313
64      : SEDESLEKENSPTPPLDKERLRSLLRPPPTGGVVMGYSSSDSLEHHPN----AVGNDLHHHHGHQCYDSVGLASTPKLSSISVA : 112
2950   : SEDESLEKENSPTPPLDKERLRSLLRPPPTGGVVMGYSSSDSLEHHPN----HYCNDLHHHHGHQCYDSVGLASTPKLSSISVA : 112

          340      *          360      *          380      *          400      *          420
AtBRX   : GSSNYGPGSYHGPP--PMDAARITTTSSRDPP-SMSNASEMCA-EWIEEDEPGVITIRQL-----SDGTRELRR--- : 315
AtBRX1  : -----P--PMDAARITTTSSRDPP-SMSNASEMCG-EWVEEDEPGVITIRQL-----PDGTRELRR--- : 302
OsBRX1  : KTETSSMDASMRSSSSPEEVDL--SR-ELSVSVSNASD-CERWVEEDEPGVITIRAL-----PGGIRELRR--- : 368
OsBRXL2 : HHFNLL-NSAAGPAMPYDPSRGTSSRDASVVISNASDLATEWVEODEPGVITIREF-----GDGTRELRR--- : 382
64      : KTETSSMDASMRSSSSPEEVDRLG--ELSVVISNASD-CERWVEEDQPGVITIRXXFAWWHORASPCPIOPREVQRDAC : 190
2950   : KTETSSMDASMRSSSSPEEVDRLG--ELSVVISNASD-CERWVEEDQPGVITIRXXFAWWHORASPCPIOPREVQRDAC : 190

          440      *          460      *          480      *          500
AtBRX   : -VRFSRERFGVHAKTWVEQNR--ERIQTCYL*----- : 344
AtBRX1  : -VRFSRERFGVHAKTWVEQNR--DRIQTCYL----- : 331
OsBRX1  : -VRFSREKFSMHARLWVEENR--ARIHDCYL*----- : 397
OsBRXL2 : -VRFSRERFGERAKVWVEQNR--DRIHAQYL----- : 411
64      : EAMVGREP-DEDTTVPLRCRNRSTDENKINFAVDM----- : 224
2950   : EAMVGREP-DEDTTVPLRCRNRSTDENKINFAVDM----- : 224

```

Figura 13. Allineamento tra le proteine *AtBRX*, *AtBRX1* (della famiglia genica *BRX* di *Arabidopsis thaliana*), *OsBRX1*, *OsBRX2* (della famiglia genica *BRX* di *Oryza sativa*) e le proteine mutanti di *Hordeum vulgare* no. 64 e 2950. Sono stati evidenziati con un cerchi rossi le posizioni delle mutazioni “di-senso”. Di particolare interesse è la mutazione della linea 64 poiché si tratta di un cambiamento “non-sinonimico” tra un residuo aminacidico carico negativamente (acido aspartico) ed un aminoacido neutro idrofilico (asparagina) in una posizione della proteina sempre conservata tra tutti i geni *BRX*. Con le parentesi sono state evidenziate le posizioni dei domini conservati della proteine *BRX*

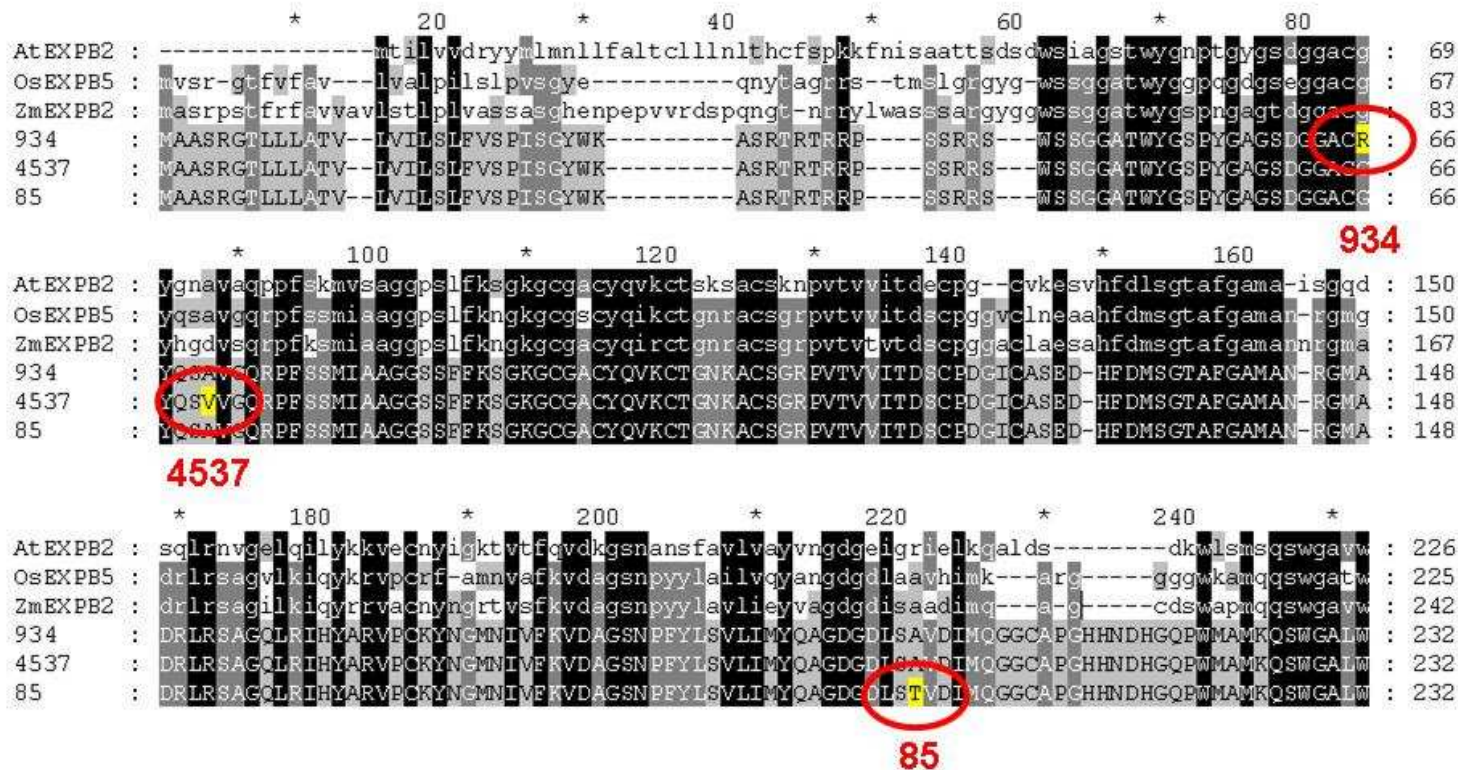


Figura 14. Allineamento delle tre proteine mutanti di *HvEXPβ1* (934, 4537 e 85) con le proteine omologhe *AtEXPβ2* (*Arabidopsis thaliana*), *OsEXPβ5* (*Oryza sativa*) e *ZmEXPβ2* (*Zea mays*) (Kwasniewski e Szarejko, 2006). Sono state evidenziate con un cerchi rossi le posizioni delle mutazioni “di-senso” individuate. In particolare la mutazione della pianta 934 determina una sostituzione aminoacidica tra un aminoacido neutro a basso ingombro sterico (la glicina) con un aminoacido a lunga catena laterale carico positivamente (l’arginina) in una regione altamente conservata della proteina.

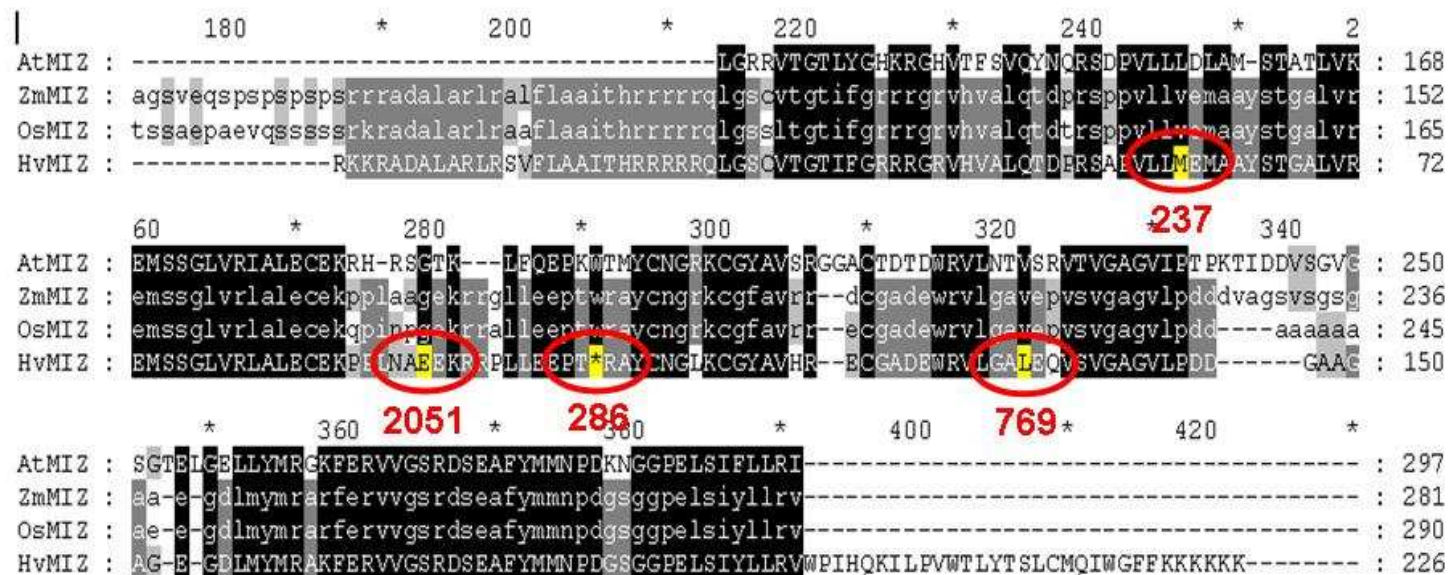


Figura 15. Allineamento delle tre proteine *MIZ1* (*mizu kusei*) di *Arabidopsis thaliana* (*AtMIZ1*), *Zea mays* (*ZmMIZ1*), *Oryza sativa* (*OsMIZ1*) e *Hordeum vulgare* (*HvMIZ1*). Sono state evidenziate, nella sequenza proteica di *Hordeum vulgare*, le posizioni delle mutazioni di-senso introdotte dal trattamento mutageno. Da notare la mutazione della linea 286 poiché introduce, al centro della sequenza codificante, un codone di stop (mutazione “non-senso”). Anche le tre mutazioni “di-senso” sembrano essere di notevole importanza, poiché avvengono in posizioni altamente conservate della proteina.

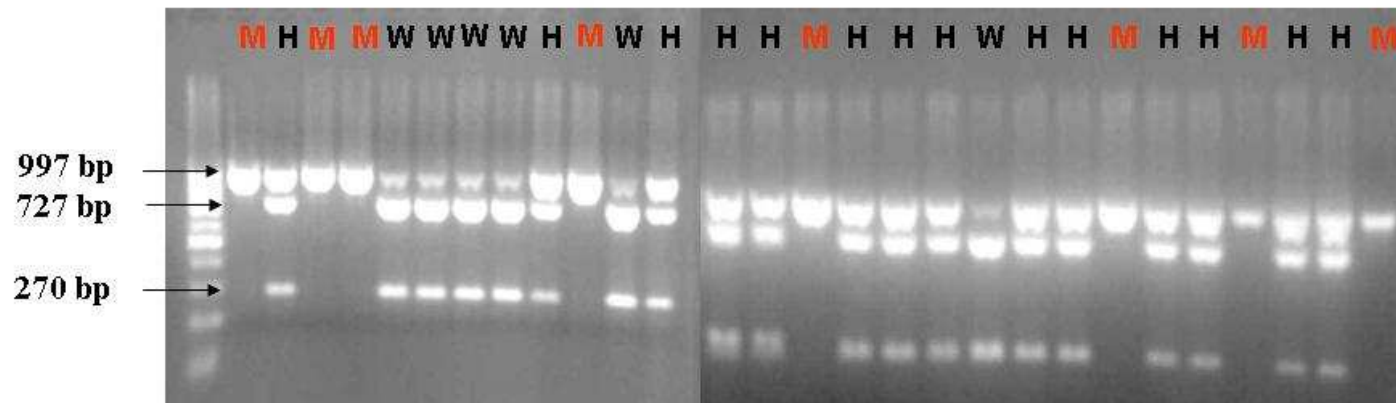


Figura 16: Analisi con marcatore CAPS di 30 piante M_3 ottenute per autofecondazione del mutante 934. Gli ampliconi PCR di 997 bp sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *BciIV* che riconosce una sequenza specifica interna all'amplicato e determina la formazione di due bande a basso peso molecolare di 270 bp e 725 bp. In presenza della mutazione puntiforme, il sito di riconoscimento specifico dell'enzima viene modificato e non viene generato alcun taglio molecolare. In figura sono stati indicati con **M** i campioni mutanti (è visibile solo la banda dell'amplicato intero a 996 bp), con **W** i campioni "wild-type" (sono visibili solo le bande a 725 bp e 270 bp) e con **H** i campioni eterozigoti (sono visibili tutte le bande).

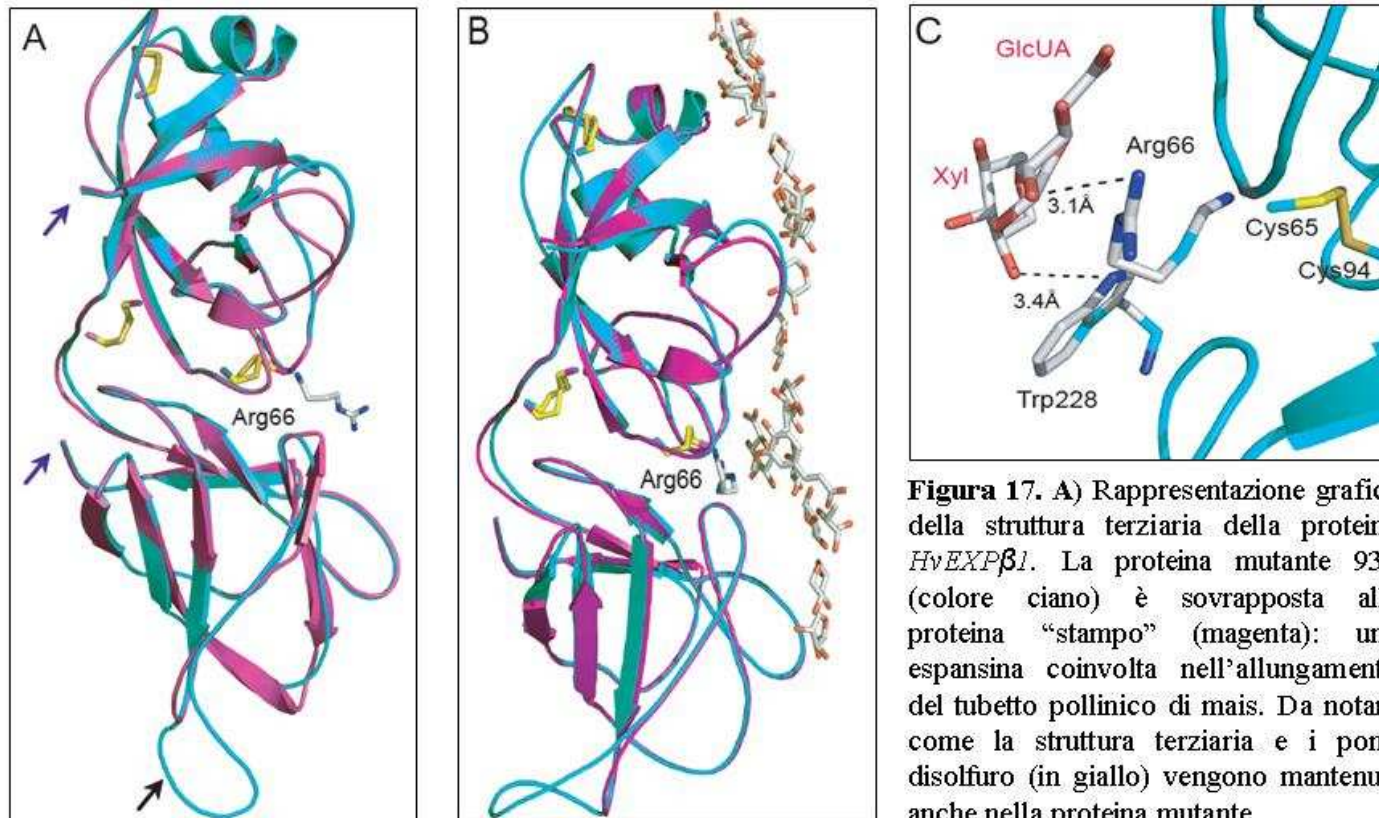


Figura 17. A) Rappresentazione grafica della struttura terziaria della proteina *HvEXPβ1*. La proteina mutante 934 (colore ciano) è sovrapposta alla proteina “stampo” (magenta): una espansina coinvolta nell’allungamento del tubetto pollinico di mais. Da notare come la struttura terziaria e i ponti disolfuro (in giallo) vengono mantenuti anche nella proteina mutante.

B) Rappresentazione grafica della proteina mentre interagisce con il substrato della reazione enzimatica (glucoarabinoxilano). Da notare che il residuo di Arg (grigio) risulta ruotato verso l’interno della proteina e non interferisce negativamente con il legame con il substrato. C) Particolare dell’interazione tra l’Arg66 e il Trp228 con il substrato della reazione. I due aminoacidi partecipano nell’interazione con i residui xilosilico (Xyl) e glucoronilico (GlcUA) del glucoarabinoxilosio. I due legami H sono evidenziati con linee tratteggiate.

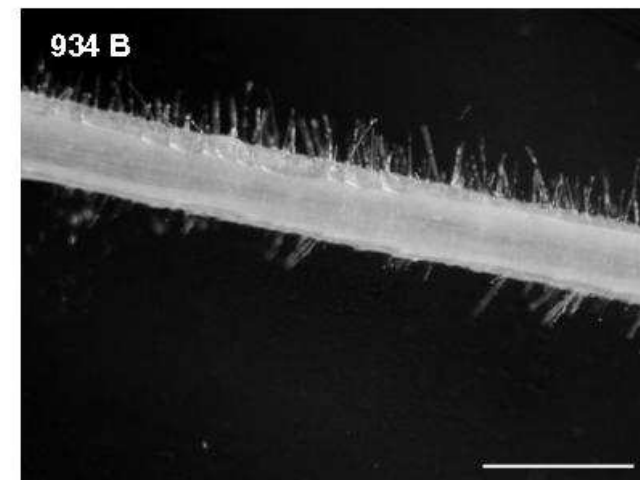
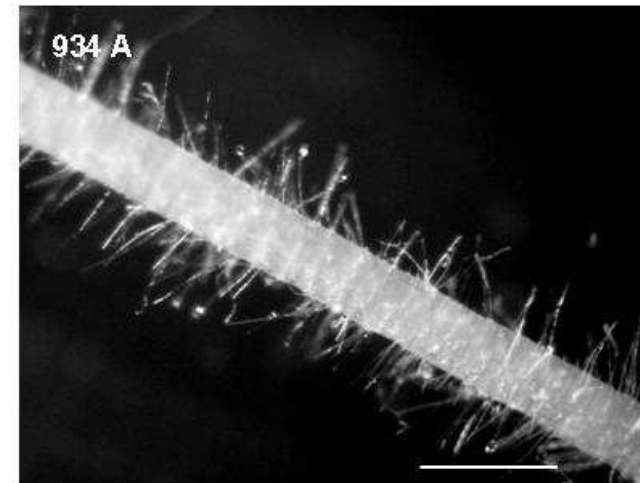
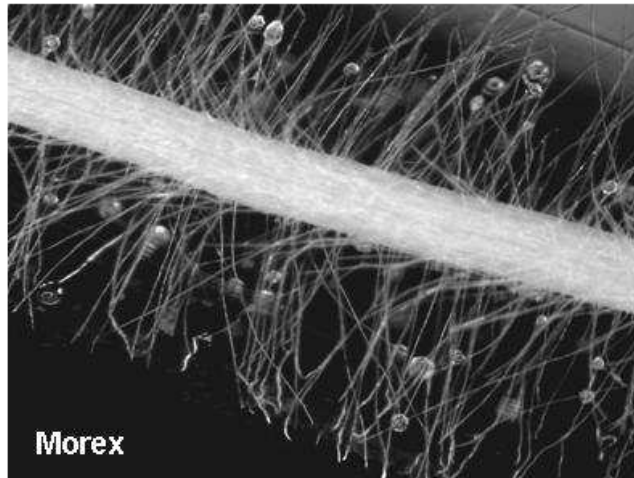


Figura 18. Immagini ottenute allo stereomicroscopio del mutante 934 per il gene *HvEXPβ1*. In alto a sinistra una porzione di radice di Morex “wild-type” utilizzato come controllo. A destra due mutanti della linea 934 in cui risulta evidente le presenza di peli radicali di lunghezza molto ridotta.