

Sessione Genetica e genomica 1

Sequenziamento de novo e annotazione del trascrittoma di *Arundo donax*

Bobbio Valentina¹, Mariotti Mauro Giorgio¹, Borghi Cristina², Laura Marina², Andrea Allavena², Toppino Laura³, Rotino Giuseppe Leonardo³, Bagnaresi Paolo⁴ e Cattivelli Luigi⁴

andrea.allavena@entecra.it

¹ Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova

² CRA-FSO, Unità di ricerca per la floricoltura e le specie ornamentali. Sanremo (IM)

³ CRA-ORL, Unità di ricerca per l'orticoltura, Montanaso Lombardo (LO)

⁴ CRA-GPG, Centro di ricerca per la genomica e la post-genomica animale e vegetale, Fiorenzuola d'Arda (PC)

Arundo donax o canna comune è una specie originaria del Sud Est asiatico, ben ambientata nel bacino del Mediterraneo. Un confronto tra 7 specie ligno-cellulosiche, effettuato da Di Candilo (2008), ha messo in evidenza che *A. donax* ha una superiore capacità di produzione di biomassa (40 t/ha di sostanza secca). Per un insieme di varie caratteristiche costituisce un ottimo candidato per la produzione di bioetanolo. Questo lavoro ha l'obiettivo di caratterizzare il trascrittoma di *A. donax* per arricchire le conoscenze genetiche della specie. L'RNA totale è stato estratto da radici e da culmi. Sono state create e sequenziate con tecnologia GS FLX 454 Titanium due librerie normalizzate di cDNA (radici RL, culmi CL). Le sequenze ottenute sono state pulite ed assemblate con il programma CLC Genomics Workbench. Gli unigenes (contigs e singlets) sono stati annotati con i tools Blast2GO (blast cut off 10^{-3} ; annotation cut off 10^{-6}) e KAAS (metodo bi-directional best hit ESTs). La stima della copertura del sequenziamento è stata valutata con il tool ESTcalc e mediante il confronto con 357 ortologi ultra conservati (UCOs) di *A. thaliana* (e-value pari a 10^{-10}). Il sequenziamento ha prodotto 825.369 reads per CL e 776.467 reads per RL con una lunghezza media di 438,7bp e 383,4 bp rispettivamente. Dopo la pulizia sono state utilizzate per l'assemblaggio 764.231 e 701.227 sequenze, rispettivamente per CL e RL, che hanno dato origine a 164.248 unigenes (81.443 contigs e 82.815 singlets) per CL e 146.278 (72.149 contigs e 74.132 singlets) per RL. L'analisi con il tool KASS ha assegnato un KO number a 4.383 unigenes di CL e a 4.231 unigenes di RL. Con il tool ESTcalc la copertura dell'assemblaggio è stata valutata pari all'82% del trascrittoma per i culmi e al 78% del trascrittoma per le radici; il confronto dei contig coi geni UCOs ha identificato 348 (97,5%) e 347 (97,2%) dei 357 rispettivamente per CL e RL.

Valutazione della biodiversità di *Humulus lupulus* L. nel nord Italia

Tommaso Ganino, Margherita Rodolfi, Annalisa Silvanini, Deborah Beghè e Andrea Fabbri

andrea.fabbri@unipr.it

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Parma

Humulus lupulus L. è una pianta dioica perenne appartenente alla famiglia delle Cannabaceae; viene utilizzata in special modo nella birrificazione, nella quale generalmente sono impiegate varietà commerciali, selezionate per le proprietà amaricanti o aromatiche. In Italia il luppolo, che è spontaneo su tutto il territorio nazionale, ha buone potenzialità di sviluppo in quanto vi è un crescente interesse per la produzione di birre ottenute da materia prima locale. L'individuazione di genotipi di pregio, sia dal punto di vista qualitativo sia quantitativo, permetterebbe quindi di produrre una birra 100% made in Italy, più o meno nettamente diversificata da quelle aromatizzate con luppolo di origine estera. Lo scopo della ricerca è stato quello di studiare diversi genotipi di luppolo italiani, valutandone la biodiversità, per poter poi selezionare le accessioni maggiormente apprezzabili dal punto di vista della birrificazione di qualità. A tale scopo sono stati raccolti 69 rizomi di luppolo da piante reperite in ambienti naturali nelle regioni Emilia Romagna (56), Lombardia (6), Veneto (4) e Toscana (3). Questi sono stati poi utilizzati per la propagazione in vaso; successivamente a radicazione e germogliamento, i luppoli sono stati messi a dimora definitiva in un campo collezione a Marano sul Panaro (MO). Per valutare la variabilità genetica, sui 69 individui di luppolo è stata effettuata un'analisi molecolare. Il DNA genico è stato ottenuto seguendo la metodologia CTAB (con leggere modifiche); per l'amplificazione degli estratti sono state utilizzate sette coppie di primers SSR. Le relazioni tra le accessioni sono state studiate mediante cluster analysis UPGMA e distanza euclidea. Basandosi sulla statistica è stato generato un dendrogramma da cui è emerso un alto grado di biodiversità all'interno della popolazione in studio. Sono stati quindi identificati 61 genotipi con cui è stato possibile costruire una banca dati con i profili genetici delle accessioni.

Realizzazione di mappe genetiche in nocciolo (*Corylus avellana* L.) e castagno (*Castanea* spp.)

Roberto Botta, Chiara Sartor, Francesca Dini, Chiara Beltramo, M. Angelica Sandoval Prando, Paolo Boccacci, Nadia Valentini, Ezio Portis e Daniela Torello Marinoni

roberto.botta@unito.it

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino

La realizzazione di mappe genetiche e gli studi sul trascrittoma forniscono conoscenze di base sul genoma delle specie ed informazioni utili a rendere più efficiente il miglioramento genetico. E' in corso presso il DISAFA la costruzione di mappe genetiche di nocciolo (*Corylus avellana* L.) e castagno (*Castanea* spp.) finalizzata allo studio di caratteri di interesse agronomico e tecnologico. Per il nocciolo sono in osservazione circa 300 semenzali ottenuti dall'incrocio controllato 'Tonda Gentile delle Langhe' x 'Meraviglia di Bollwiller' (sin. 'Hall's Giant'). La progenie è segregante per diversi caratteri quantitativi, tra cui: resistenza all'eriofide, epoca di maturazione, epoca di fioritura, resistenza al balanino, forma, qualità e dimensione delle nocciole. Per costruire la mappa del castagno è stato realizzato un impianto con una progenie di 200 individui, ottenuta incrociando 'Bouche de Bétizac' (*C. sativa* X *C. crenata*) con la cultivar 'Madonna' (*C. sativa*). Tale progenie consente di studiare il determinismo genetico della resistenza all'insetto galligeno *Dryocosmus kuriphilus*, reperita in 'Bouche de Bétizac', e verrà utilizzata per individuare QTL per caratteri di interesse agronomico e di qualità del frutto. La mappa costruita per il nocciolo comprende 130 marcatori ed è allineabile con quella sviluppata dall'Oregon State University. Per il castagno la mappa ottenuta ha consentito di individuare 11 gruppi di linkage ricostruendo parzialmente l'assetto cromosomico del castagno e posizionando il gene di resistenza. Per il castagno, inoltre, ci si è avvalsi di tecniche di sequenziamento next-generation del trascrittoma con il duplice scopo di isolare geni di interesse e nuovi marcatori molecolari, che potranno essere impiegati nella saturazione della mappa genetica. Ricerca finanziata da: Regione Piemonte, Interreg Alcotra 2007-2013, Fondazione Cassa di Risparmio di Torino, Ferrero s.p.a.

Caratterizzazione morfologica e genetica di una collezione di *Hydrangea* spp.

Beatrice Nesi, Sara Lazzereschi e Simona Pecchioli

beatrice.nesi@entecra.it

CRA-VIV, Unità di ricerca per il vivaismo e la gestione del verde ambientale ed ornamentale, Pescia (PT)

Al genere *Hydrangea* appartengono 23 specie originarie di una vasta area temperata dell'Asia orientale e del conti-

nente americano. Il genere è suddiviso in due sezioni: *Hydrangea*, alla quale appartengono le specie coltivate, *Cornidia*. Dalle più note ortensie (*Hortensia* Group) con grandi infiorescenze globose bianche rosa e azzurre, si passa a *Hydrangea* *Lacecap* o *Teller*, con infiorescenza piatta, alle fioriture a pannocchia di *H. paniculata* e di *H. quercifolia*, fino ad arrivare alle quasi sconosciute rampicanti (*H. anomala petiolaris*). Presso il CRA-VIV di Pescia è stata allestita una collezione di *Hydrangea* spp., comprendente 66 accessioni appartenenti alle seguenti specie: *H. macrophylla* subsp. *macrophylla* (*Hortensia* e *Lacecap* Group), *H. paniculata*, *H. serrata*, *H. villosa*, *H. quercifolia*, *H. anomala* subsp. *petiolaris*, *H. arborescens*, *H. heteromalla*, *H. involucrate*, *H. aspera* e 3 genotipi di *Schizophragma* spp. Al fine di caratterizzare e studiare la diversità e le relazioni fra le accessioni, nel presente studio si riporta l'attività di caratterizzazione morfologica e genetica. Facendo riferimento a 28 descrittori CPVO-UPOV specifici, i dati morfometrici raccolti sono stati analizzati con il software 'R computer package version 2.14.0', per un'analisi multivariata per cluster, che ha consentito di costruire una matrice delle distanze fra i diversi gruppi e di ottenere un dendrogramma, nel quale sono riportate le relazioni tra i genotipi conservati. Successivamente tale caratterizzazione è stata integrata con quella genetica, utilizzando marcatori molecolari RAPD. Le informazioni ricavate da ogni marcatore sono state utilizzate per calcolare la matrice delle distanze fra i diversi individui con il coefficiente di Nei. L'analisi dei dati è stata realizzata con i programmi MEGA 4.0 ed NTSYS pc2.02, che hanno permesso di ottenere un dendrogramma dei dati genetici analizzati.

"Embryo rescue" e marcatori SSR per il miglioramento genetico dell'uva da tavola

Sergio Currò¹, Filippo Ferlito², Antonino Pisciotta³, Stefano La Malfa¹, Rosario Di Lorenzo³ e Alessandra Gentile¹

gentilea@unict.it

¹ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania

² CRA-ACM, Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee, Acireale (CT)

³ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università di Palermo

Il comparto italiano dell'uva da tavola negli ultimi anni ha fatto registrare una diminuzione delle esportazioni a causa della carente produzione di uva senza semi sempre più richiesta dal consumatore. La diffusione di cultivar apirene procede a rilento per la difficoltà di individuare genotipi in grado di garantire rese soddisfacenti con costi di produzione sostenibili. Appare pertanto necessario costituire nuove cultivar soprattutto mediante l'incrocio controllato. A tal fine l'impiego di genitori entrambi stenospermocarpi-

ci (che presentano cioè semi che abortiscono precocemente e rimangono di consistenza erbacea) è indispensabile per potere ottenere maggiori livelli di apirenia nella progenie ed è reso possibile dall'utilizzo della tecnica dell'embryo rescue. Tale tecnica determina però alcune problematiche quali la poliembrionia e la conseguente incertezza sull'origine delle piantine ottenute. Obiettivo del lavoro è stato quello di ottenere nuovi genotipi mediante incrocio, successiva coltura degli embrioni in vitro, ed analisi molecolare della progenie. Tra il 2010 ed il 2011 sono state effettuate delle impollinazioni controllate utilizzando come parentali 7 cultivar apirene ed 1 con semi per un totale di 19 combi-

nazioni. La coltura in vitro degli ovuli estratti dai frutti ancora immaturi ha permesso di ottenere 205 individui. Le progenie ottenute dagli incroci del 2010 sono state analizzate con 5 marcatori microsatelliti specifici per *Vitis*. L'analisi ha dimostrato la natura ibrida dell'80,5% degli individui. Ciò ha permesso, quindi, di scartare gli individui originati da autofecondazione o da embriogenesi somatica a partire dai tessuti materni. Le piante ottenute dalle impollinazioni del 2011 sono attualmente in fase di analisi. Le viti sono attualmente coltivate fuori suolo al fine di accelerare i tempi di entrata in produzione per la valutazione complessiva delle loro caratteristiche.

Sessione Genetica e genomica 2

Analisi di espressione genica in semenzali di citrange Carrizo allevati in condizioni di anaerobiosi

Paola Caruso¹, Franca Locatelli², Paola Tononi³, Giuseppe Reforgiato Recupero¹, Massimo Delledonne³ e Concetta Licciardello¹

paola.caruso@entecra.it

¹ CRA-ACM, Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee, Acireale (CT)

² Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, Milano

³ Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

Il deficit di ossigeno nelle piante è un fenomeno frequente in natura. Le principali cause possono essere riconducibili ad alluvioni o eccessive irrigazioni o ad un eccesso di microflora aerobia nel suolo. Lo stress causato dalla mancanza di ossigeno nelle piante produce principalmente una riduzione della respirazione e quindi una bassa produzione di energia e l'accumulo di composti tossici del metabolismo anaerobico. Per alleviare questo problema le piante hanno sviluppato degli adattamenti morfologici e metabolici, i principali dei quali includono l'induzione di vie anaerobiche e fermentative. Nel presente studio è stato utilizzato un Custom Array in cui sono state sintetizzate quasi 8000 sonde disegnate su sequenze espresse isolate in radici del genere *Citrus* e di generi affini. Il chip è stato ibridato con RNA di radici di citrange Carrizo wild type e di una linea transgenica altamente esprimente un fattore trascrizionale di riso coinvolto nella risposta al deficit di ossigeno. L'obiettivo del lavoro consiste nello studio dei geni sovra e sottoespressi di campioni wild type e transgenici sottoposti e non ad anaerobiosi, al fine di comprendere i meccanismi che si attivano in condizione di anossia. In generale l'ibridazione del chip ha portato all'attivazione di 492 geni, di

cui il 28,95% è coinvolto nei processi di ossidoriduzione, il 28,41% nella risposta agli stress, il 18,28% nella risposta agli stimoli chimici. I geni differenziali derivanti dal confronto delle varie tesi sono stati validati mediante analisi di espressione in Real time RT-PCR. In particolare la piruvato decarbossilasi, l'alcol deidrogenasi e la saccarosio sintasi sono risultati sovraespressi nella condizione di anossia rispetto al controllo, confermando l'attivazione dei principali geni del metabolismo anaerobico.

Caratterizzazione biochimica e molecolare della risposta delle mele allo stress da ipossia

Monica Zermiani¹, Elisabetta Zonin¹, Maura Begheldo¹, Dubravka Cukrov², Andrea Zuccolo², Massimo Mercadini³, Riccardo Velasco⁴, Benedetto Ruperti¹ e Pietro Tonutti²

benedetto.ruperti@unipd.it

¹ Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse naturali e Ambiente, Università di Padova

² Scuola Superiore Studi Universitari Sant'Anna, Istituto Scienze della Vita, Pisa

³ MARVIL engineering srl, Magré (BZ)

⁴ Istituto Agrario S. Michele all'Adige, Fondazione Edmund Mach, S. Michele all'Adige (TN)

La conservazione delle mele in atmosfera controllata dinamica (DCA) si basa sull'impiego di stress ipossici per il contenimento delle fisiopatie (riscaldamento superficiale). Le risposte biochimiche e molecolari delle mele alle fluttuazioni dell'O₂ hanno importanti ripercussioni applicative ma sono solo parzialmente chiarite. La regolazione delle risposte all'ipossia nelle piante si basa sull'azione chiave delle NADPH ossidasi (NOX) e dei fattori di risposta all'etilene (ERF) del gruppo VII. Nel genoma del melo sono state

identificate 16 sequenze geniche che codificano proteine con similarità con le NOX (RBOH) di *Arabidopsis*, di cui dieci con i domini conservati tipici, e 14 sequenze ERF-VII. Lo studio delle risposte molecolari delle mele all'ipossia è stato condotto su frutti della cv Granny Smith sottoposti a tre diversi livelli di ossigeno e due livelli di ipossia (20 kPa, 0,8 kPa e 0,4 kPa O₂)(DCA), campionati a 1, 2, 3, 4 e 5 settimane di conservazione a 1°C. L'attività, analizzata su frazioni microsomiali, e la trascrizione dei geni NOX sono apparsi regolati in modo differenziale nel cortex e nell'epicarpo in funzione del livello di O₂. L'analisi globale dei profili di trascrizione, condotta mediante RNAseq su cortex di frutti conservati per 3 settimane rispetto ai frutti alla raccolta, ha evidenziato la regolazione di circa 14.000 trascritti, di cui 1.400 regolati selettivamente nel campione mantenuto a 0,4 kPa e altri 1.400 specifici nel campione a 0,8 kPa. La differenza apparentemente minima in termini di concentrazione di ossigeno ha, quindi, effetti marcati sulla regolazione dell'espressione genica, più pronunciati a 0,4 kPa meno a 0,8 kPa. Ciò è vero sia per specifici geni marcatori della risposta all'ipossia come alcool deidrogenasi (*ADHI*) o i geni della biosintesi dell'etilene (*ACSI* e *ACO1*), sia per la differente espressione dei fattori ERF-VII, e suggerisce un possibile ruolo di questi ultimi nei meccanismi di "percezione" dell'ossigeno nei frutti.

I geni *OeCNR* regolano la dimensione della drupa di olivo sin dalle prime fasi dello sviluppo dell'ovario?

Marco Cirilli¹, Sivia Caporali², Eleonora Frioni¹, Andrea Paoletti², Alessandra Zega¹, Gabriele Latini¹, Hava Rapoport³, Gaetano Perrotta⁴, Adolfo Rosati² e Rosario Muleo¹

cirilli@unitus.it

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università della Tuscia

² CRA-OLI, Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

³ Instituto de Agricultura Sostenible, Cordoba (Spagna)

⁴ ENEA CR Trisaia, Rotondella (MT)

Le dimensioni differenti dell'oliva sembrerebbero instaurarsi sin dall'ovario e sarebbero da attribuire al numero di divisioni cellulari che avvengono nelle prime fasi del suo sviluppo. Per verificare tale ipotesi sono stati condotti studi molecolari in due cv di olivo con i caratteri, dimensione dell'ovario e dimensione del frutto, divergenti: piccoli, in cv Canino, grandi in cv Ascolana Tenera. In una libreria SSH di cDNA e 454 di fiore della cv Leccino sono state individuate sequenze dei geni *OeCNR1* e *OeCNR2*, ortologi ai geni *fw2.2* di *S. lycopersicum*, appartenenti al locus QTL a cui è attribuita, per il carattere dimensione del frutto, una variazione del 30% del totale. Al fine di ricostruire un network di regolazione dei due caratteri, sono

stati individuati e studiati altri geni implicati nella regolazione della divisione cellulare e della dimensione degli organi, quali *ERECTA* e *ERECTA-like*, attivi ambedue nella segnalazione delle auxine; *AINTEGUMENTA*, la cui proteina coniuga i segnali dei due gruppi di geni menzionati e regola la proliferazione cellulare; *OeBEE1*, pivot del segnale dei brassinosteroidi, implicato nella distensione cellulare. Inoltre, sono stati isolati e studiati geni del ciclo cellulare e della sintesi delle poliammine. Nella fase di sviluppo dell'ovario e di crescita del frutto, in Canino, *OeCNR1* è più espresso che in cv Ascolana Tenera; *OeCNR2*, in Canino, è più espresso solamente nella fase iniziale dello sviluppo del frutto. Questi dati concordano con quanto osservato in pomodoro, in cui il gene *fw2.2*, ortologo di *OeCNR1*, che regola negativamente la divisione cellulare ed è indicato come il gene candidato nel controllare la ridotta divisione cellulare dell'ovario. I dati osservati permettono di ipotizzare la presenza di una rete di regolazione tra fattori e determina il destino della dimensione dell'ovario e del frutto.

Effetti dell'epoca di defogliazione sulla composizione biochimica e sul trascrittoma delle bacche della cv Sangiovese (*V. vinifera*) nel corso della maturazione

Chiara Pastore¹, Sara Zenoni², Marianna Fasoli², Mario Pezzotti², Giovanni Battista Tornielli² e Ilaria Filippetti¹

chiara.pastore3@unibo.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna

² Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

La defogliazione pre-fioritura, comportando l'asportazione di foglie basali fotosinteticamente attive, associa al prevedibile effetto microclimatico (incremento dell'esposizione luminosa del grappolo) modifiche nel rapporto source-sink che in primo luogo portano ad una riduzione dell'allegagione e della produzione. Diversamente, l'asportazione delle foglie basali del germoglio all'invaiaatura, pur mantenendo lo stesso effetto sul microclima del grappolo, esercita modifiche più ridotte sul rapporto source-sink poiché le foglie rimosse presentano, in tale fase, attività fotosintetica inferiore rispetto a quelle mediane e apicali. Su queste basi nella presente ricerca è stata applicata per la prima volta un'analisi trascrittomica su larga scala della bacca nel corso della maturazione, ad integrazione degli aspetti agronomici e biochimici, nel confronto di viti di Sangiovese sottoposte a defogliazione pre-fioritura e all'invaiaatura con viti di controllo non defogliate. A livello agronomico e biochimico è stato rilevato come la defogliazione in pre-fioritura sia stata in grado di migliorare la composizione della bacca, incrementando il rapporto source-sink (in seguito alla riduzione produttiva e ad un recupero di superficie fogliare) e la concentrazione di zuccheri, antociani e flavonoli. La defoglia-

zione all'invaiaitura non ha causato nessun effetto sull'accumulo zuccherino, ma ha provocato una diminuzione nella concentrazione di antociani. Nonostante tali risposte, in entrambi gli stadi di defogliazione le bacche hanno mostrato a fine invaiatura un forte riarrangiamento a livello trascrittomico che può essere interpretato come sintomo di transitorio ritardo nella maturazione delle bacche sottoposte ad entrambi i trattamenti, ma che si è successivamente diversificato con l'emergere, nelle bacche provenienti da piante sottoposte a defogliazione pre-floritura, di molteplici modulazioni geniche specifiche che possono spiegare i cambiamenti biochimici osservati.

Risposte fisiologico-molecolari di due genotipi di pesca allo stress da taglio indotte durante la preparazione dei prodotti di IV gamma

Roberta Tosetti¹, Federico M. Giorgi², Francesca Tardelli³, Alice Tadiello⁴, Valerio Zaffalon⁵, Lucia Guidi³, Rossano Massai³, Claudio Bonghi⁵, Livio Trainotti⁴ e Pietro Tonutti¹

r.tosetti@sssup.it

¹ Scuola Superiore Studi Universitari Sant'Anna, Istituto Scienze della Vita, Pisa

² Center for Computational Biology and Bioinformatics, Columbia University (USA)

³ Dipartimento di Scienza Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali, Università di Pisa

⁴ Dipartimento di Biologia, Università di Padova

⁵ Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

La IV gamma include quei prodotti che hanno subito un processo di minima lavorazione (lavaggio, taglio e confezionamento) e destinati al consumo fresco. Dopo il successo commerciale dei prodotti a foglia di IV gamma, anche i prodotti frutticoli sono divenuti oggetto di studio per l'applicazione di questa tecnologia. L'ampia disponibilità di genotipi di pesco (*Prunus persica* spp.) e la loro variabilità fenotipica rappresentano un interessante punto di partenza per la selezione di varietà idonee. In questo studio sono state valutate le risposte allo stress da taglio di frutti di due varietà di pesco a pasta gialla, Glohaven (GH), pesca melting flesh, e Big Top (BT), nettarina slow melting flesh, conservati per 72 h a 4°C dopo il taglio. Valutazioni tecnologiche e biochimiche evidenziano una diversa risposta delle due varietà, in particolare BT sembra meno influenzata dal taglio rispetto a GH che va più rapidamente incontro a fenomeni di senescenza. Analisi trascrittomiche (microarray μ PEACH3.0) dei campioni effettuate 24h dopo il taglio hanno evidenziato che il trascrittoma di GH reagisce più marcatamente di BT alla ferita (individuati 7005 geni significativi con $p < 0.01$ in GH e 4162 in BT). L'analisi ontologica dei geni individuati mette in evidenza che molti di essi appartengono a vie metaboliche correlate agli stress, alla trasduzione di segnali mobili e al controllo trascrizionale. Tra questi, cinque sembrano particolarmente interessanti in quanto evidenziano pattern di trascrizione diversi nei due genotipi: due fattori di trascrizione (famiglie AP2/ERF e WRKY), due HSP (HSP20, HSP90) e un recettore LRR. Questi geni, o le loro famiglie, sono implicati nei meccanismi di difesa e, più in particolare, nelle prime fasi della risposta a diversi stress. Il profilo trascrizionale di questi geni è stato valutato attraverso RealTime PCR durante le 72 h dell'esperimento. I risultati confermano come GH appaia più influenzata dallo stress da taglio rispetto a BT.

Sessione Genetica e genomica 3

Il pioppo come specie arborea modello per lo studio delle risposte all'eccesso di zinco

Luca Sebastiani¹, Andrea Ariani¹, Stefania Romeo¹, Alessandra Francini¹, Antonio Minnocci¹ e Andrea Andreucci²

l.sebastiani@sssup.it

¹ BioLabs, Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore di Studi Universitari Sant'Anna, Pisa

² Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

La contaminazione da zinco (Zn) degli agro-ecosistemi è in rapida e preoccupante diffusione. Lo Zn è diffuso nei

fitofarmaci e fertilizzanti, è presente nelle acque d'irrigazione e nei materiali organici ammendanti. Lo Zn è un microelemento essenziale per gli organismi vegetali, ma il superamento delle soglie ottimali porta rapidamente a problemi di tolleranza e tossicità. Gli studi sulla risposta delle piante all'eccesso di Zn hanno dimostrato la presenza di meccanismi di compartimentalizzazione a vari e di attivazione dei sistemi di difesa da stress ossidativo. Poco conosciute sono, invece, le risposte a livello molecolare, anche se sono stati identificati dei trasportatori di ioni metallici (per es.: la famiglia delle proteine ZIP – zinc-regulated transporter e iron-regulated transporter-like protein –, o le cation diffusion facilitator e le ABC transporter) che possono contribuire all'accumulo selettivo e riduzione della tos-

sicità. Nelle arboree i dati sono ancora limitati, ma nel pioppo sono state identificate le Metal Tolerance Protein, capaci di favorire il sequestro dello Zn nel vacuolo, le Phytochelatin Synthase 1 e le Heavy Metal ATPase coinvolte nella detossificazione e nell'efflusso di Zn. In questo lavoro sono presentati i risultati sull'identificazione e lo studio dei meccanismi molecolari responsabili dell'assorbimento/esclusione e detossificazione dello Zn in specie arboree modello del genere *Populus*. Gli studi hanno permesso l'identificazione mediante microarray e mRNAseq di numerosi geni differenzialmente espressi durante la risposta all'eccesso di Zn. Alcuni di questi geni sono stati caratterizzati funzionalmente, clonati e trasferiti, mediante *Agrobacterium*, in *Populus alba* per ottenere una maggiore conoscenza del loro ruolo nei meccanismi di difesa. Lo scopo finale è quello di rendere disponibili e trasferibili queste conoscenze ad altre specie arboree che in futuro potrebbero trovare difficoltà di coltivazione in suoli inquinati dallo Zn.

La regolazione ormonale dell'invaiaitura della bacca di vite: un possibile modello basato sull'analisi dei profili trascrizionali di bacche trattate con acido naftalenacetico

Massimiliano Corso¹, Fiorenza Ziliotto¹, Fabio Massimo Rizzini¹, Angela Rasori¹, Alessandro Botton¹ e Claudio Bonghi^{1,2}

massimiliano.corso.1@studenti.unipd.it

¹ Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Animali, Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

² Centro Interdipartimentale per la Ricerca in Viticoltura ed Enologia, Università di Padova

I meccanismi regolativi attivi durante la maturazione della bacca d'uva sono prevalentemente basati sulle interazioni tra auxina, etilene, acido abscissico (ABA) e brassinosteroidi (BR). In particolare, le auxine agiscono come repressori della maturazione, mentre etilene, ABA e BR operano come induttori. Per apportare nuove informazioni sulle interazioni ormonali presenti all'avvio della maturazione (invaiaitura) è stato effettuato un trattamento con auxina sintetica (acido naftalacetico, NAA), una settimana prima dell'invaiaitura. Il trattamento causa un forte ritardo della progressione degli eventi associati alla maturazione: aumento di dimensione della bacca, accumulo di antociani e zuccheri e riduzione degli acidi organici. Questi eventi sono accompagnati da significative variazioni della trascrizione di geni associati ai metabolismi primario, secondario e ormonale. I dati relativi a questi ultimi sono stati analizzati mediante HORMONOMETER, uno strumento bioinformatico che consente di valutare gli effetti dell'applicazione di ormoni e le loro interazioni sulla base di dati trascrittomici. I risultati ottenuti evidenziano che, a sette giorni dal trattamento, le concentrazioni di auxina tornano a livelli biologicamente

compatibili grazie all'attivazione di un processo di omeostasi. Questa ipotesi è suffragata da analisi di trascritti (via qPCR) che mostrano un'induzione di geni coinvolti nella coniugazione (*GH3*-like) della auxine e di quelli che ne regolano l'azione (*IAA4*- e *IAA31*-like). Per quanto attiene alle interazioni è stato osservato che l'NAA induce i geni della biosintesi dell'etilene (*ACS* e *ACO*) ma esercita un forte effetto negativo su quelli associati alla sua percezione (*EIN4*) ed azione (*ERFs*). A questo si contrappone un inaspettato effetto sinergico, seppur limitato, delle auxine sulla catena trasduttiva dell'ABA. L'insieme dei dati ottenuti è stato organizzato in un modello della regolazione ormonale dell'invaiaitura che sarà presentato e discusso.

Isolamento di marcatori molecolari per la valutazione della qualità in rucola

Marina Cavaiuolo, Anna Spinardi e Antonio Ferrante

antonio.ferrante@unimi.it

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano

Metodi rapidi e non distruttivi sono necessari per valutare la qualità dei prodotti di quarta gamma lungo la catena produttiva che va dalla raccolta alla conservazione. La qualità dei prodotti vegetali in post-raccolta non può essere migliorata, ma soltanto preservata, l'identificazione di marcatori molecolari può essere utile nel determinare la minima variazione di qualità fin dal primo giorno di conservazione. L'obiettivo del nostro lavoro è quello di isolare marcatori molecolari utilizzando una strategia di sequenziamento dell'RNA (RNA-seq). La rucola (*Diplotaxis tenuifolia* L.) coltivata in floating system è stata sottoposta a diversi tipi di stress abiotici. In pre-raccolta sono stati imposti stress salino (200 mM NaCl), stress radicale da alte temperature (40°C), carenza di nitrati (assenza di NH₄⁺/NO₃⁻), mentre in post-raccolta è stato imposto stress da freddo (4°C), taglio e perdita di acqua. Il campionamento delle piante è stato effettuato dopo 24 ore. L'RNA totale è stato estratto dai campioni stressati e dal controllo e sequenziato tramite Illumina HiSeq™ 2000. L'RNA-seq ha permesso di isolare quei geni la cui espressione è specifica per ogni stress oltre a quelli la cui espressione è comune a tutti gli stress. Tali geni codificano per proteine associate alla senescenza, a processi degenerativi e a perdita di qualità e, pertanto, vengono considerati come marcatori di qualità. I risultati di RNA-seq saranno validati tramite PCR quantitativa e i livelli di espressione genica saranno monitorati in diverse condizioni durante il periodo di conservazione della rucola. L'espressione dei potenziali marcatori durante la conservazione sarà correlata con le variazioni dei principali parametri qualitativi. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n. 289719 (Project QUAFETY)

Ringiovanire dalla fase adulta: il meccanismo genetico e epigenetico in pesco

Rosario Muleo¹, Marco Cirilli¹, Emilia Caboni², Calogero Iacona³, Eleonora Frioni¹, Alessandra Zega¹ e Gabriele Latini¹

muleo@unitus.it

¹ Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia. Università della Tuscia

² CRA-FRU, Centro di ricerca per la Frutticoltura, Roma

³ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali, Università di Pisa

Gli organismi superiori si riproducono gamicamente solo dopo essere diventati adulti. Nelle piante il cambiamento/transizione di fase è osservabile per le modifiche morfologiche e comportamentali, che avvengono a livello cellulare e/o di organi (forma della foglia, radicazione, fioritura, ecc.) e in quelle arboree avviene anche dopo molti anni dalla germinazione del seme. La comprensione dei network di regolazione della transizione aiuta a comprendere le reti genetiche ed epigenetiche che ne regolano l'evento. Se molto è conosciuto sulla direzionalità della transizione, da giovanile ad adulto, poco lo è sulla direzionalità opposta. In questa ricerca sono stati studiati signalomi genetici ed epigenetici coinvolti nella transizione e induzione fiorale, quali: percezione della qualità della luce, del fotoperiodo, del termoperiodo, dell'orologio biologico endogeno, dei flussi endogeni, e il reguloma epigenetico della metilazione del DNA, della acetilazione degli istoni e del complesso dei microRNA, validando i risultati con il degradoma. Particolare attenzione è stata posta all'espressione di geni pivot, implicati nei sistemi di traffic signal e del dialogo tra signalomi, quali: *CO*, *FT* e *FLC*, *API*, *LEAFY* e *Fruitfull* e i geni *SPL*. Sono stati studiati semenzali, piante adulte e in altre in cui era stata indotta giovanilità con la coltura in vitro. I risultati evidenziano variazioni di metilazione e acetilazione dei promotori e delle regioni trascriventi in base all'azione ambientale. Un sincronismo tra i determinanti genici ed epigenetici: a livelli alti di trascritti di miR156 e dei geni pivot, osservati in semenzali e piante ringiovanite, corrispondono bassi livelli dei geni target del miR156. Nei tessuti di piante adulte, alti livelli dei trascritti di miR172 sono stati osservati e bassi livelli dei trascritti dei geni pivot inducenti la transizione. I risultati sono discussi sotto gli aspetti di ecofisiologia della produzione e della propagazione agamica.

Studio delle relazioni tra la rete regolativa dello sviluppo del mesocarpo e del seme di pesco attraverso approcci trascrittomici

Valerio Zaffalon¹, Alice Tadiello^{2,3}, Angela Rasori¹, Livio Trainotti², Claudio Bonghi¹ e Angelo Ramina¹

valerio.zaffalon@studenti.unipd.it

¹ Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Animali, Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

² Dipartimento di Biologia, Università di Padova

³ Centro di Ricerca e Innovazione Fondazione Edmund Mach. S. Michele all'Adige (TN)

Nel pesco, lo sviluppo del seme e del pericarpo sono strettamente correlati. Una esaustiva analisi, permessa dall'utilizzo di un whole-genome array e da RNA-seq, ha consentito una migliore definizione della rete regolativa trascrizionale che caratterizza lo sviluppo dei due organi. Le analisi condotte sulla nettarina Fantasia hanno mostrato che tra i geni prevalentemente modulati durante lo sviluppo dei due organi vi sono geni coinvolti nella regolazione del metabolismo, nella risposta agli ormoni e nel differenziamento. Analisi di arricchimento funzionale hanno evidenziato che nelle prime fasi di sviluppo di entrambi gli organi sono sovra-rappresentati fattori di trascrizione (FT) della famiglia squamosa promoter binding protein (SBP9- e SPB3-like), mentre FT di tipo Homeobox e Growth Regulation Factor (GRF-like) sono sovra-rappresentati nella fase matura, i primi nel frutto e i secondi nel seme. In genotipi diversi da Fantasia, la trascrizione di questi FT viene influenzata dalle diverse tempistiche di sviluppo dei due organi. Nella cv precoce Springcrest, caratterizzata da un embrione immaturo alla raccolta del frutto, si assiste ad un anticipo nell'accumulo dei trascritti di *SBP9*-like e *GRF*-like, mentre l'accumulo è ritardato nella selezione slow-ripening (slr), caratterizzata dal blocco dello sviluppo del mesocarpo a fronte dello sviluppo pressoché normale dell'embrione. Come avviene in altre specie, la quantità dei trascritti di *SBP9*-like e *GRF*-like è regolata anche attraverso il silenziamento genico mediato da microRNA. L'accumulo di miR157 e miR396 è concomitante alla diminuzione della quantità di trascritto dei rispettivi target *SBP9*-like e *GRF*-like. Tale relazione viene riscontrata sia in presenza di accoppiamento (Fantasia), che di discrasia nello sviluppo di seme e mesocarpo (Springcrest e slr). L'insieme dei risultati suggerisce che la dinamica di sviluppo del seme viene influenzata in maniera sensibile dalla durata del ciclo di sviluppo del pericarpo.

Sessione Genetica e genomica - Poster

Selezione per la resistenza o tolleranza a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) di genotipi mutagenizzati tramite EMS

Daniele Bevilacqua, Massimo Terlizzi, Angelo Di Cintio, Teresa Rosato, Alisea Sartori, Patrizia Ferrante, Fabrizio Alberti, Marco Scortichini e Guido Cipriani

alisea.sartori@entecra.it

CRA-FRU, Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Alla luce dei rilevanti eventi di moria a livello mondiale del kiwi, causati da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA), è stato svolto un lavoro per indurre mutazioni su materiale di *Actinidia* spp. da sottoporre successivamente a infezione tramite inoculo batterico così da testare un'eventuale resistenza/tolleranza allo stesso. Più di 10.000 semi di varia origine e ottenuti da libera impollinazione: 3540 di Hayward (*Actinidia deliciosa*), 3300 di RII-28, una selezione di *Actinidia chinensis* del CRA-FRU di Roma e 3240 semi di C8, una selezione di *Actinidia chinensis* ottenuta dall'Università di Udine, sono stati trattati con l'agente mutageno EMS (Etil-Metano Sulfonato) a tre diverse concentrazioni (0,2; 0,3; 0,4%). Le tesi ed un controllo (360 semi) sono state successivamente seminate, in plateau alveolare, nel mese di dicembre. Un tasso di germinazione superiore al 90% è stato registrato dopo 120 giorni dalla semina. Le piantine che manifestavano completa formazione delle prime due foglie sono state sottoposte ad una prima inoculazione con PSA, ceppo CRA-FRU 8.43 (1-2 x10⁷ ufc/ml) mediante infiltrazione della sospensione batterica nel mesofillo fogliare. Dopo quattro mesi le piantine sopravvissute sono state nuovamente inoculate mediante ferita al fusticino. Dopo 30 giorni dalla prima inoculazione, la sopravvivenza media di Hayward è stata del 10,6%, quella di RII-28 del 25,8% mentre per il C8 è del 9,2%. Dopo un mese dalla seconda inoculazione, risultavano ancora vive ben 137 piantine di Hayward, 65 semenzali di RII-28 e 24 di C8.

Recenti risultati delle attività di breeding fragola coordinate da CRA-FRF

Walther Faedi e Gianluca Baruzzi

gianluca.baruzzi@entecra.it

CRA-FRF, Unità di Ricerca per la Frutticoltura, Forlì

Il CRA-FRF conduce e coordina in Italia numerose attività di breeding sulla fragola, cofinanziate da Enti pubblici

e privati. L'obiettivo è di costituire nuovo materiale genetico adatto alle aree colturali in cui si opera, caratterizzato da buona produttività e rusticità della pianta ed elevate proprietà organolettiche e nutraceutiche del frutto. La metodologia operativa è quella del breeding classico: scelta dei parentali; programmazione ed esecuzione di incroci; selezione in campo dei semenzali; valutazione delle selezioni nei campi di I° e II° livello attraverso specifici rilievi, analisi e determinazioni. Attualmente sono attivi una decina di programmi di breeding. Nel metapontino è attivo dal 2006 un programma pubblico-privato cofinanziato dalla Soc. Piraccini Secondo: l'obiettivo principale è di costituire varietà precoci, a basso fabbisogno in freddo, pienamente adatte agli ambienti meridionali. Pircinque, diffusa nel 2011, combina ottima qualità del frutto ad elevata precocità. La selezione PIR 2, di prossima diffusione, è interessante anche in altri areali meridionali per la sua marcata precocità ed elevata produttività. Nel veronese si mira a costituire materiale genetico adatto alla tradizionale "coltura autunnale". La Provincia di Verona e le 2 organizzazioni dei produttori Aposcaligera e Consorzio Ortofrutticolo Zeviano (COZ) cofinanziano questa azione di ricerca avviata nel 1995. Garda, diffusa nel 2012, si distingue per elevata consistenza e dolcezza della polpa dei frutti. Le selezioni VR 4 e VR 12 sono nella fase finale di valutazione. Nel cesenate dal 1978 si persegue l'obiettivo di costituire cultivar adatte alla coltura di pieno campo e alle colture biologiche. L'attività è stata quasi costantemente finanziata dalla Regione Emilia-Romagna, tramite il CRPV di Cesena e dalle tre principali Organizzazioni dei Produttori di Cesena: ApoConerpo, Apofruit Italia e Orogel Fresco. Le selezioni FC 15, FC 30.8 e FC 32 sono in fase valutativa finale.

Il Database SAFENUT Europeo: un valido strumento per la biodiversità di nocciolo e mandorlo

Loretta Bacchetta¹, Bruno Bellon², Barbara Di Giovanni¹, Maria Laura Padovani¹ e Carlo Tronci¹

loretta.bacchetta@enea.it

¹ ENEA Casaccia UTAGRI, Roma

² Spazio Verde, 35124 Padova

Nell'ambito del progetto Europeo Agri Gen Res SAFENUT sul reperimento, caratterizzazione e conservazione delle risorse genetiche di nocciolo e mandorlo, è stato sviluppato un database per la diffusione e fruizione delle informazioni agli utenti e per promuovere la pianificazione e l'implementazione di attività relative alla conservazione,

l'uso sostenibile e la condivisione di benefici derivati dal loro utilizzo. La necessità di sviluppare, conservare e scambiare tali informazioni è specificamente riconosciuta nella Convenzione sulla Diversità Biologica (articoli 7d e 17). Nel modello concettuale del database sono state individuate tre grandi aree di intervento: l'acquisizione dei dati, le politiche di accesso, gli strumenti amministrativi, i risultati. I dati sono stati forniti dalle attività di SAFENUT, dall'atlante nazionale multimediale Scigno e sono in link con il database Europeo Prunus. Tre sono i diversi livelli di accesso considerati: l'accesso pubblico; l'accesso al gruppo di lavoro SAFENUT ed accesso privato. La banca dati è stata strutturata in accordo e compatibilmente con le specifiche del "multi-crop passport descriptors" (MCPD) definito da Bioversity international e FAO e dai risultati scientifici del progetto SAFENUT. Le informazioni disponibili nel database riguardano descrittori specifici e i "passport data" delle singole accessioni (58 per il nocciolo e 248 per il mandorlo), le foto, note bibliografiche e caratteristiche biochimiche (contenuti in acidi grassi, fenoli, proteine, minerali) e molecolari (marcatori microsatelliti). Il database realizzato è accessibile agli utenti tramite il portale <http://safenut.casaccia.enea.it/db/>. La parte "pubblica" del sito è stata progettata tenendo conto delle "Disposizioni per favorire l'accesso dei soggetti disabili agli strumenti informatici". Nel presente lavoro viene riportata la descrizione del database e possibili criticità per la valorizzazione e mantenimento di questa importante risorsa.

Nuove selezioni di fragola ad elevata qualità nutrizionale: l'importanza del genotipo selvatico

Jacopo Diamanti¹, Franco Capocasa¹, Francesca Balducci¹, Roberto Cappelletti¹, Maurizio Battino² e Bruno Mezzetti¹

f.balducci@univpm.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

² Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche

La consolidata importanza della qualità nutrizionale dei frutti svolge un ruolo fondamentale nei programmi di miglioramento genetico, in particolare della fragola, favorendo di conseguenza la selezione di genotipi con elevate caratteristiche qualitative e nutrizionali. I programmi di breeding sino ad ora sviluppati si sono concentrati nell'utilizzo di combinazioni di incrocio (CI) intra-specifiche di parentali di *Fragaria x ananassa* portando alla generazione di un ampio numero di varietà che rispondono agli standard qualitativi ed agronomici richiesti dal mercato ortofrutticolo. Infatti i breeders si sono concentrati prevalentemente nella selezione di genotipi adattabili alle diverse esigenze

pedo-climatiche degli ambienti di coltivazione, con produzione di frutti di bell'aspetto e grandi dimensioni, insieme ad un'elevata consistenza del frutto, così da favorire una maggiore shelf-life del prodotto fresco. Il nostro gruppo, contemporaneamente allo sviluppo di programmi miglioramento genetico canonici, ha portato avanti programmi di breeding su fragola utilizzando generazioni successive di back-crossing inter-specifico, utilizzando la specie *F. virginiana* ssp. *glauca*. Dalla continua selezione e valutazione della caratteristiche qualitative e nutrizionali della progenie generata dalla suddetta CI, è stato osservato un importante incremento delle caratteristiche sensoriali e nutrizionali dei frutti di fragola, in particolare in riguardo al contenuto in polifenoli e antociani totali dei frutti. Inoltre le selezioni avanzate generate da tale combinazione di incrocio sono state ulteriormente valutate in riguardo al loro contenuto in acido ascorbico e folati, ed è stata caratterizzata la loro composizione in antocianine. I risultati ottenuti confermano l'importanza del genotipo selvatico nella programmazione di CI e successivi *back crossing* con il fine di aumentare le caratteristiche nutrizionali e sensoriali dei frutti di fragola.

Valutazione di selezioni di melo (*Malus x domestica* Borkh.) nell'ambiente Marchigiano derivanti da incroci con "Gelata"

Franco Capocasa, Francesca Balducci e Jacopo Diamanti

f.capocasa@univpm.it

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

La selezione condotta per molti anni da agricoltori e vivaisti per ricercare nuove specie e varietà in grado di fornire redditi e produzioni elevate ha contribuito all'impoverimento della disponibilità di patrimonio genetico. Da ciò ne è derivata l'attività di recupero e conservazione del materiale vegetale appartenente al germoplasma nazionale che ha comportato tra le conseguenze pratiche la riduzione della disponibilità di variabilità genetica per caratteri di interesse agronomico e pomologico. Oggi la tendenza è la reintroduzione di una maggiore rusticità nel materiale vegetale di nuova costituzione, disponibile dai vecchi biotipi locali che si sono adattati alle specifiche condizioni ambientali, abbinata alle elevate qualità del frutto raggiunte con un lungo e irrinunciabile lavoro di miglioramento genetico. Il germoplasma locale del melo di certo offre prospettive interessanti per il recupero di caratteri agronomici e pomologici interessanti. La valutazione, dal punto di vista vegetativo, produttivo e qualitativo, di 120 selezioni ottenute dalla combinazione di incrocio tra due varietà policlonali affermate come la "Red Delicious" e la "Golden Delicious" e Florina ed un parentale comune "Gelata", vecchia varietà del germoplasma di Marche ed Abruzzo per un totale di 8 combinazioni di incrocio, ha permesso di individuare e

caratterizzare nuove selezioni con caratteri produttivi, qualitativi e di resistenza alle malattie molto interessanti a confronto con gli standard qualitativi commerciali delle attuali varietà più diffuse. Le selezioni individuate sono ora in valutazione per un loro possibile rilascio varietale o come possibili nuovi parentali utilizzabili in futuri programmi di miglioramento genetico.

Una tecnologia per l'analisi dell'identità epigenetica e genetica delle piante propagate *in vitro*

Marco Cirilli¹, Emilia Caboni², Calogero Iacona³, Alessandra Zega¹, Eleonora Frioni¹, Gabriele Latini¹ e Rosario Muleo¹

cirilli@unitus.it

¹ *Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università delle Tuscia, Viterbo*

² *CRA-FRU, Centro di ricerca per la Frutticoltura, Roma*

³ *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali, Università di Pisa*

La coltura *in vitro* può introdurre mutazioni nelle piante, evento noto come variazione somaclonale. La variabilità, epigenetica e genetica, è sfruttata nel miglioramento genetico ma è un ostacolo nella propagazione ove è richiesta l'identità genetica ed epigenetica delle piante. I meccanismi inducenti le mutazioni sono solo in parte noti: quelle genetiche introducono modifiche di basi nel DNA, quelle epigenetiche metilano il DNA, modificano la struttura cromatinica e l'espressione di small-RNA, in una complessa interazione, apparentemente casuale. Le tecniche di analisi della metilazione sviluppate sono poco impiegabili nella diagnosi *true-to-type* delle piante, sia per il costo elevato che per l'indispensabile conoscenza a priori dei siti in cui le modifiche potrebbero accadere. In assenza di tecniche economiche che identificano mutazioni epigenetiche e genetiche casuali, è stata sviluppata una tecnica dai costi ridotti che identifica le mutazioni e costruisce un sistema di tracciabilità dell'identità delle piante propagate *in vitro*. La tecnica impiega la *High Resolution Melting* e la quantificazione in silico, di regioni genomiche funzionali, dei siti metilati e delle loro T_m putative. Le T_m ed il numero di siti predette sono impiegate per costruire una curva di regressione non-lineare, che è tarata con la T_m del frammento in analisi privo di siti di metilazione. La curva dei valori della T_m assegna al frammento amplificato il corrispondente numero di siti metilati. Il metodo è stato applicato in piante propagate *in vitro*, testando la metilazione del promotore e della codificante di alcuni geni coinvolti nei processi di metilazione/demetilazione e rimodellamento della cromatina. I risultati sono stati validati sequenziando i frammenti ottenuti. La tecnica identifica con discreta accuratezza il numero di siti metilati. Il costo ridotto e la semplicità rende la tecnica idonea in analisi dell'identità delle piante propagate agamicamente.

Identificazioni di geni associati alla tolleranza a stress osmotici attraverso il confronto dei profili trascrizionali di portainnesti resistenti e suscettibili

Massimiliano Corso¹, Alessandro Vannozi¹, Giorgio Valle², Claudio Bonghi¹, Angelo Ramina¹ e Margherita Lucchin¹

massimiliano.corso.1@studenti.unipd.it

¹ *Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Animali, Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova*

² *Centro Ricerche Interdipartimentale Biotecnologie Innovative, Università di Padova*

In vite gli stress abiotici, idrico e salino in particolare, sono causa di notevoli perdite nella produzione e possono compromettere la qualità del vino. Una delle strategie messa in atto per far fronte a queste problematiche è l'impiego dei portainnesti tolleranti. Lo scopo di questo studio è quello approfondire le conoscenze sui meccanismi di risposta agli stress osmotici per giungere all'identificazione di marcatori molecolari da utilizzare nella selezione assistita di portainnesti tolleranti. A tal fine foglie e radici dei portainnesti 101.14 e M4, rispettivamente suscettibile e tollerante agli stress idrico e salino, sono state campionate in condizioni progressive di stress, fino al raggiungimento di condizioni di carenza idrica (30% della capacità di campo) ed eccesso di NaCl (20mM NaCl). In tutti i campioni raccolti sono stati determinati i profili trascrizionali mediante tecnologia mRNAseq. Le analisi trascrittomiche evidenziano risposte specifiche e aspecifiche agli stress imposti. In entrambi i genotipi analizzati, le risposte aspecifiche, comuni a stress idrico e salino, sono riconducibili alla modulazione di geni coinvolti nella biosintesi e trasduzione del segnale dell'Acido Abscissico (ABA), nelle reazioni di ossido-riduzione e nel metabolismo della parete cellulare. Soltanto il genotipo M4, invece, mostra una risposta specifica allo stress idrico basata sull'induzione di geni legati alla trasduzione del segnale dell'etilene, al trasporto delle auxine e al metabolismo dei jasmonati (JA). Questi ultimi, in particolare, sembrano svolgere un ruolo chiave in quanto l'espressione dei geni coinvolti nella loro biosintesi (12-oxofitodienoato riduttasi 1 e allene ossido sintasi) e nella trasduzione del segnale (dominio ZIM 1), così come di quella di geni JA-dipendenti (stilbene-sintasi) risulta significativamente alterata a seguito dell'imposizione di stress osmotici. Questo studio è finanziato dal progetto AGER "SERRES", grant n° 2010-2105.

La Collezione di pesco e nettarine presso il Centro Nazionale di Germoplasma Frutticolo del CRA-FRU di Roma: caratterizzazione, ricerca e valorizzazione di varietà autoctone

Petra Engel, Flavio Roberto De Salvador, Maria Antonietta Palombi e Carlo Fideghelli

isftc@libero.it

CRA-FRU - Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

La collezione e conservazione del germoplasma vegetale è fondamentale per la salvaguardia del patrimonio genetico presente nelle varie specie. E' questo uno degli aspetti centrali postulati dalla Convenzione sulla Biodiversità e del Trattato Internazionale FAO sulle Risorse Genetiche Vegetali per l'Agricoltura e l'Alimentazione. Il Centro Nazionale di Germoplasma Frutticolo (CNGF) del CRA-FRU di Roma comprende una collezione di pesco e nettarine (*Prunus persica*, *P. persica* var. *laevis*), attualmente composta da oltre 900 accessioni uniche, di cui circa un terzo è di origine italiana. L'accurata caratterizzazione e documentazione di questo germoplasma permette di identificare le accessioni autoctone promettenti sia per l'introduzione diretta nei sistemi di produzione locali sia per un loro impiego in programmi di miglioramento genetico per la costituzione di varietà idonee per una frutticoltura sostenibile e la produzione di frutti di qualità. Fin da ora, i dati rilevati permettono di evidenziare nell'ambito delle varietà di *P. persica* numerose accessioni autoctone che si caratterizzano per uno o più caratteri positivi riguardanti il comportamento vegeto-produttivo, aspetti biologici, caratteristiche carpologiche e organolettiche, nonché la tolleranza ad avversità biotiche ed abiotiche. Alcune di queste accessioni, per lo più vecchie varietà locali, sono già state in passato, utilizzate con successo nella costituzione di nuove cultivar per cui si ritiene che l'esplorazione di tale patrimonio genetico sia molto importante per i futuri programmi di miglioramento genetico.

Diversità genetica di *Castanea sativa* Miller in Canton Ticino (Svizzera meridionale)

Dario Donno¹, Gabriele Loris Beccaro¹, Daniela Torello-Marinoni¹, Giorgio Binelli², Paolo Boccacci^{1,4}, Roberto Botta¹, Alessandro Kim Cerutti¹, Maria Gabriella Mellano¹, Marco Conedera³ e Giancarlo Bounous¹

dario.donno@unito.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Grugliasco (TO)

² Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate, Università dell'Insubria, Varese

³ Swiss Federal Research Institute WSL, Bellinzona (Svizzera)

⁴ Istituto di Virologia Vegetale CNR, Grugliasco (TO)

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) mostra un'elevata variabilità di caratteri morfologici, caratteristiche vegetative e riproduttive, morfologia del frutto, qualità del legno, adattabilità e resistenza a stress biotici e abiotici. Il range attuale di distribuzione della specie è stato fortemente influenzato dalle migrazioni umane e si pensa che siano stati i Romani a giocare un ruolo cruciale nella diffusione della sua coltivazione in Europa. In Svizzera, i castagni si trovano per lo più al Sud (Canton Ticino), in una regione in cui il dibattito circa l'origine del germoplasma locale, derivato dalla sopravvivenza o dalla migrazione spontanea di *C. sativa* sul territorio o dovuto all'introduzione della specie durante la colonizzazione romana, è ancora aperto. Il presente studio ha avuto lo scopo di contribuire a descrivere la situazione genetica di *C. sativa* nel Canton Ticino, dando un contributo al dibattito sul suo carattere originario. L'area di studio è localizzata in Svizzera, sul versante sud delle Alpi, dove sono state campionate tre popolazioni di *C. sativa* e analizzati 9 loci SSR. Le popolazioni hanno mostrato un alto grado di diversità, come si osserva nella maggior parte delle popolazioni naturali di specie arboree. Infatti, si è osservato che tutti i 9 loci SSR sono risultati polimorfici (non sono stati rilevati alleli fissi) e la diversità genetica, misurata come eterozigosità attesa (He), varia notevolmente nelle popolazioni considerate (tra 0,647 e 0,721 in media). I risultati suggeriscono che tre patrimoni genetici omogenei abbiano contribuito alla formazione delle tre popolazioni campionate, anche se la strutturazione genetica del germoplasma delle popolazioni di castagno analizzate è risultata molto ridotta, come confermato dal livello relativamente basso di differenziamento ($F_{ST} = 0.029$) tra i siti.

Nuove varietà di nocciolo (*Corylus avellana* L.) ottenute mediante incrocio tra le varietà Tonda Gentile Romana e Tonda di Giffoni

Daniela Farinelli, Mirco Boco, Agostino Tombesi

daniela.farinelli@unipg.it

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

Dal 1996 al 2011 sono state valutate le caratteristiche agronomiche delle piante, la qualità organolettica ed industriale dei frutti di 8 genotipi di nocciolo selezionati nell'ambito di un programma di miglioramento genetico per incrocio tra le varietà Tonda Gentile Romana e Tonda di Giffoni, condotto dal 1983 presso il Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia. I genotipi più validi sono risultati: - F6P200: per precocità di maturazione (3° decade di agosto), elevata e costante produttività, ridotta attività pollonifera, frutti sferoidali di grandezza media, elevata pelabilità e ottimo sapore del tostato; - F15P5: per elevata produttività, resa dello sgusciato buona (48%) e frutto sferoidale; - F4P32: per

ridotta attività pollonifera, frutti sferoidali, elevata omogeneità del calibro (76%) e pelabilità (83%), buon sapore del tostato; - F21P12, F25P29 e F13P9: per elevata resa alla sgusciatura (53,6%, 52,3% e 50,6% rispettivamente). Tutti i genotipi hanno mostrato assente o ridotta sensibilità alle principali problematiche fitosanitarie del nocciolo. Considerando i dati vegeto – produttivi e la qualità organolettica e industriale dei frutti sono stati iscritti il genotipo F6P200 al Registro Nazionale Varietà di nocciolo - Lista A, con il nome di Tonda Franciscana, e 4 altri genotipi (F15P5, F21P12, F4P32 e F19P29) al Registro Nazionale Varietà di nocciolo - Lista B, rispettivamente con il nome di Volumnia I, Volumnia II, Volumnia III e Volumnia IV.

Caratterizzazione di varietà di olivo siciliane ed estere con marcatori microsatelliti

Francesco Scollo, Giuseppina Las Casas, Gaetano Distefano, Alberto Continella, Stefano La Malfa e Alessandra Gentile

gentilea@unict.it

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania

L'olivo è una delle colture economicamente più importanti del bacino mediterraneo, con una produzione destinata per la quasi totalità alla trasformazione in olio d'oliva. In Sicilia, l'olivo è presente con una molteplicità di accessioni, dovute non solo alla biologia riproduttiva prevalentemente allogama e spesso auto-sterile, ma anche alla pluralità degli ambienti di coltivazione che caratterizzano il territorio dell'isola nonché alla sua posizione geografica, crocevia del Mediterraneo. Lo scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare un'ampia collezione di varietà siciliane e del sud Italia nonché alcune varietà coltivate nei paesi del bacino del Mediterraneo. L'analisi è stata condotta su 65 genotipi coltivati presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Catania e presso il Campo Collezione di Germoplasma di Olivo, realizzato dal CNR-ISAFOM e Provincia Regionale di Enna e sito in C.da Zagaria - Enna. 47 di questi genotipi rappresentano la quasi totalità delle accessioni siciliane riscontrate in letteratura, 10 varietà sono originarie del sud Italia e 8 sono varietà straniere. Per il presente lavoro sono stati utilizzati 8 primer SSR già impiegati in lavori di caratterizzazione di varietà di olivo; nel caso di genotipi che sono risultati sinonimi, l'indagine è stata approfondita con ulteriori due primer. In tal modo è stato possibile caratterizzare la collezione, riscontrando una variabilità in certi casi più ampia di quella attesa, confermando alcune sinonimie già riportate in letteratura, ma anche distinguendo alcune cultivar che da alcuni autori erano riportate come identiche. Lo studio non ha evidenziato la presenza cluster ben definiti, ma al contrario ha evidenziato la presenza di una ampia variabilità intraspecifica all'interno del pool genetico esaminato.

Sulle tracce delle varietà di melo coltivate in Italia in epoca storica: creazione di un database per la consultazione documentale

Mauro Bergamaschi, Daniela Giovannini e Walther Faedi

daniela.giovannini@entecra.it

CRA-FRF, Unità di Ricerca per la Frutticoltura, Forlì

La coltivazione del melo in Italia ha origine antica. Delle migliaia di varietà, autoctone o d'importazione, transitate nel nostro Paese, solo una piccola percentuale è stata preservata ed è oggi mantenuta presso repository pubblici e privati. Le denominazioni delle varietà antiche spesso richiamano peculiari caratteristiche estetiche o fisiologiche del frutto, l'epoca di raccolta o il luogo di origine. Ciò ha creato una grande confusione ed incertezza nell'identificazione delle corrispondenze tra nome, fenotipo e genotipo. Infatti, frequenti sono, in particolare, i casi di omonimia o di sinonimia. La ricerca di documenti e informazioni su origine, caratteristiche dell'albero e del frutto, eventuali sinonimi, e immagini riconducibili ad un nome varietale, rimangono gli unici strumenti per cercare di chiarire dubbi e verificare la corrispondenza tra il germoplasma oggi conservato e le antiche descrizioni. La digitalizzazione delle informazioni, utile ad una consultazione facile e rapida, rappresenta un'ulteriore evoluzione del processo di documentazione. Nell'ambito del progetto RGV-FAO del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, che ha come obiettivi finali la salvaguardia e la valorizzazione delle risorse genetiche vegetali, CRA-FRF ha avviato una ricerca storico-documentale per identificare le varietà di melo coltivate in Italia in epoca storica. Sono stati consultati volumi che trattano la pomologia e la coltura del melo in Italia appartenenti a diverse biblioteche pubbliche e banche dati contenenti testi storici digitalizzati e disponibili a titolo gratuito sul WEB. Le principali informazioni sono state catalogate su foglio elettronico acquisendo, mediante la digitalizzazione, il documento consultato. E' stato strutturato un apposito programma informatico, che attraverso specifiche interrogazioni permette, oltre alla rapida consultazione del catalogo elettronico (composto attualmente da oltre 5900 record), di visionare i documenti originali.

Prime osservazioni di mutagenesi cumulata su due cultivar di arancio Tarocco

Giuseppe Russo, Santo Recupero, Paola Caruso, Marco Caruso, Donata Pietro Paolo e Giuseppe Reforgiato Recupero

giuseppe.russo@entecra.it

CRA-ACM, Centro di ricerca per l'agrumicoltura e le colture mediterranee, Acireale (CT)

Nel 2009 presso il CRA-ACM è stato intrapreso un pro-

gramma di mutagenesi mediante irraggiamento con raggi gamma su due cultivar di arancio dolce (*Citrus sinensis* Osbeck), Tarocco Scirè nuc.D2062 e Gallo nuc.C898. L'irraggiamento è stato effettuato per tre anni successivi (2009/2011), utilizzando marze già irradiate l'anno precedente, allo scopo di aumentare la possibilità di ottenere mutanti con mutazioni cumulate. Il primo anno sono state usate dosi di 20Gy e 40Gy, in quanto in precedenti prove dosi più elevate erano risultate letali; il secondo e terzo anno è stata utilizzata la dosi di 40Gy, perché nel primo anno l'attecchimento delle marze era in percentuale simile a quelle trattate con 20Gy. In totale sono state reinnestate 200 piante con un attecchimento del 70%. Nel 2012 trenta piante irradiate nel 2009 hanno prodotto i primi frutti. Finora sono stati individuati due mutanti di Tarocco Scirè, il primo con il frutto più schiacciato e con polpa più pigmentata, il secondo con il frutto e il peduncolo molto più grossi e con una resistenza maggiore alla cascola. Nel caso del Tarocco Gallo, è stata individuata una pianta con frutti caratterizzati da un lobo pedicellare molto sviluppato simile a quello del Tarocco dal Muso.

Basi molecolari dell'avvio della maturazione in pere della cv Angelys® sottoposte a condizionamento a basse temperature

Aiman Jajo¹, Md. Abdur Rahim², Sara Serra³, Francesca Gagliardi³, Stefano Musacchi³, Livio Trainotti² e Claudio Bonghi¹

aimannethal.jajo@unipd.it

¹ Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Animali, Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

² Dipartimento di Biologia, Università di Padova

³ Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna

La sindrome della maturazione delle pere invernali può avvenire a temperatura ambiente solo dopo una preventiva esposizione a basse temperature. Questo processo, chiamato «condizionamento a basse temperature» (CBT), è in grado di stimolare la produzione di etilene, l'ormone che, nei frutti climaterici, regola gran parte dei processi caratteristici della maturazione. La durata del CBT può variare da uno a quattro mesi, tuttavia un periodo di conservazione più prolungato non garantisce l'inizio della maturazione. In questo studio, un pool di frutti della cv Angelys® allo stesso stadio di maturazione (misurato mediante l'indice IAD, parametro legato al contenuto di clorofilla) sono stati suddivisi in tre gruppi: il primo è stato avviato alla maturazione senza CBT (T0), il secondo e il terzo dopo rispettivamente uno (T1) e tre (T3) mesi di stoccaggio a 0,5 °C. Le misure fisiche e biochimiche, effettuate dopo una settimana di permanenza dei frutti a temperatura ambiente, hanno evidenziato un mancato avvio della maturazione nei campioni del T0 ed un ritardo sensibile in quelli del T3, mentre la sindrome iniziava normalmente in quelli del T1. Questo

comportamento è congruente con l'espressione di geni associati all'avvio della maturazione (*ACC ossidasi*, *Beta-galattosidasi*, *Epossido-idrolasi*, *Poli-galatturonasi*), i cui trascritti sono significativamente accumulati nel gruppo T1 e debolmente in quelli del T3, mentre nel gruppo T0 non hanno mostrato variazioni significative. Queste differenze possono essere attribuite soltanto alla durata del CBT, poiché il genoma, la fase di maturazione e le condizioni di conservazione erano uguali per tutti i gruppi. Al fine di comprendere le ragioni di queste differenze si è proceduto all'identificazione, attraverso un approccio mRNAseq, dei geni CBT-sensibili coinvolti nella rete regolativa attivata all'avvio della maturazione delle pere. Questo studio è sostenuto dal Progetto AGER INNOVAPERO, concessione n° 2010-2107.

Caratterizzazione molecolare di germoplasma di mandorlo

Gaetano Distefano¹, Stefano La Malfa¹, Marco Caruso¹, Tommaso Ferrante¹, Maria Beatrice Del Signore², Francesco Sottile² e Alessandra Gentile¹

slamalfa@unict.it

¹ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania

² Dipartimento di Scienze Agrarie Forestali, Università di Palermo

Il germoplasma mandorlicolo italiano, costituito da migliaia di cultivar e varietà locali, è caratterizzato principalmente per il suo elevato grado di diversità anche per caratteri specifici quali resistenza alla siccità, adattamento a condizioni di estate calda e asciutta, resistenza a parassiti. La variabilità di questo germoplasma, di origine certamente genetica, è strettamente legata alla lunga storia di coltivazione ed alle modalità di propagazione che hanno rapidamente determinato la diversificazione delle cultivar in diverse aree di diffusione. Va inoltre ricordato che le regioni del sud Italia ed in particolare la Sicilia hanno rappresentato una delle principali rotte commerciali attraverso le quali è avvenuta la diffusione del mandorlo lungo le sponde del Mediterraneo. In questo lavoro 9 marcatori SSR sono stati utilizzati per analizzare 113 accessioni di mandorlo che intercettano sia cultivar diffuse in Sicilia e Puglia, precedentemente raccolte in collezione, sia genotipi diffusi in altre aree del Mediterraneo, in USA e Australia. Obiettivo del lavoro è stato quello di determinare il grado di variabilità genetica tra i genotipi italiani e di chiarire le relazioni filogenetiche tra le diverse accessioni locali e straniere. Nell'ambito dei genotipi studiati sono stati complessivamente individuati 159 alleli e un numero medio di 18 alleli e di 44 genotipi per marcatore. Il valore medio del "Polymorphism Information Content" è stato di 0,85 e l'indice medio di eterozigosi è stato di 0,71. I risultati di questo lavoro di caratterizzazione confermano il fatto che l'ampia

variabilità genetica presente in diverse zone di coltivazione ha origini non solo locali ma risente dell'introduzione di genotipi di origine alloctona. L'elevato grado di diversità genetica rilevata nelle cultivar di mandorlo italiane conferma la presenza di un ampio pool genico di riferimento non ancora caratterizzato di potenziale interesse per il miglioramento genetico della specie.

Valutazione della suscettibilità di nuovi genotipi di pesco selezionati per la resistenza a sharka

Alessandro Liverani, Federica Brandi, Sandro Sirri e Daniela Giovannini

alessandro.liverani@entecra.it

CRA-FRF, Unità di Ricerca per la Frutticoltura di Forlì

La sharka, causata dal Plum pox virus (PPV), è la virosi attualmente più devastante per le drupacee, contro la quale non esistono interventi curativi. Poiché nel pesco non sono disponibili fonti di resistenza, diversi programmi di miglioramento genetico, per ottenere genotipi di pesco resistenti, fanno ricorso ad altre specie di *Prunus* come il mandorlo e il *P. davidiana* strettamente imparentate e interfertili. Nell'ambito di un progetto finanziato dal MPAAF e di recente concluso, sono state selezionate 32 accessioni (ottenute da incroci controllati tra pesco e selezioni ibride pesco×mandorlo e pesco×davidiana), classificate come resistenti o altamente tolleranti alle infezioni artificiali mediante inoculazioni col ceppo Markus del virus. Nella primavera 2011, quattro astoni per ciascuna selezione, innestate sul portinnesto GF677, sono state piantate in un'azienda peschicola veronese (località Alpo) in un'area classificata come endemica al virus PPV, allo scopo di valutare il grado di resistenza alle infezioni naturali. In aggiunta, 20 alberi del portinnesto da seme GF305 sono stati casualmente distribuiti come controllo della presenza del virus e, per l'elevata suscettibilità al virus, come ulteriore fonte di inoculo naturale all'interno della prova. Sin dalla prima stagione vegetativa, ogni albero è stato visivamente valutato per i sintomi su fiori e foglie e, a partire dal 2012, anche sui frutti. Nei casi sintomatici, la presenza del virus è stata confermata con immunotest ELISA e RT-PCR. Nel 2012 è iniziata la valutazione pomologica e qualitativa dei frutti. Dopo i primi due anni, la maggior parte degli alberi di GF305 ha mostrato sintomi e positività al virus. Sette selezioni putativamente resistenti sono risultate infette in almeno un albero della parcella; 25 non hanno finora mostrato alcun sintomo di infezione. Tra queste ultime, desta particolare interesse la selezione CRA-FRF Ma 25-10-111, in quanto presenta una buona qualità commerciale dei frutti. I risultati, non ancora definitivi, indicano che per una efficace selezione per la resistenza a PPV è imperativa la valutazione in un'area endemica.

Organogenesi da aggregati meristemati per la trasformazione genetica di cultivar e portinnesti di *Prunus* spp. per l'induzione di resistenza a PPV mediante silenziamento genico

Silvia Sabbadini¹, Luca Girolomini¹, Barbara Molesini², Oriano Navacchi³, Tiziana Pandolfini², Gianni Tacconi⁴, Cristina Crosatti⁴ e Bruno Mezzetti¹

b.mezzetti@univpm.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche

² Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

³ Vitroplant Italia srl Soc. Agricola, Cesena (FC)

⁴ CRA-GPG, Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale, Fiorenzuola d'Arda (PC)

Le drupacee, in particolare il pesco (*Prunus persica*), sono tra le specie arboree più importanti coltivate nel bacino del Mediterraneo, tuttavia infezioni virali determinate in particolare da Plum Pox virus (PPV), agente eziologico della Sharka, sono la causa di notevoli perdite agronomiche ed economiche. Al momento non ci sono mezzi di lotta diretta contro tale infezione ma solo mezzi di prevenzione non sempre efficaci e con problemi di sostenibilità ambientale e di costi per gli agricoltori. Per questo motivo molti programmi di studi genomici e di breeding tradizionale sono finalizzati a conoscere i meccanismi di resistenza. L'applicazione del breeding tradizionale al genere *Prunus* per introdurre questo carattere presenta molte limitazioni: difficoltà di reperire fonti genetiche di resistenza, tempi lunghi e introgressione di caratteri agronomicamente negativi. L'applicazione delle tecniche di trasformazione genetica, utili per studi funzionali, potrebbero essere usati per introdurre geni di resistenza individuati in *Prunus* spp. o geni per il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) capaci di indurre resistenza a virus. L'applicazione in pesco delle tecniche di trasformazione genetica non è risultata finora efficiente, in particolare nel caso di tessuti somatici. Un efficiente protocollo di rigenerazione in vitro (Mezzetti et al., 2002), mediante organogenesi, è stato adattato efficientemente, per la rigenerazione e per la trasformazione genetica di una cultivar e portinnesto di pesco e di un portinnesto di albicocco. Sono stati sviluppati e utilizzati due differenti metodi di trasformazione, quello mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, applicato su ammassi di cellule meristematiche e quello biolistico utilizzato sia per la trasformazione di ammassi meristemati che di apici vegetativi. Gli esperimenti di trasformazione genetica sono stati condotti utilizzando costrutti a "forcina" per l'induzione della resistenza a PPV tramite il meccanismo del PTGS.

Confronto dell'espressione genica nel pathway metabolico degli antociani in drupe di olivo a diverso stadio di maturazione

Ivano Forgione¹, Savino Bonavita¹, Nadia Armentano¹, Veronica Vizzarri¹, Adriana Chiappetta² e Innocenzo Muzzalupo¹

innocenzo.muzzalupo@entecra.it

¹ CRA-OLI, Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

² Università della Calabria, Lab. Citofisiologia, Arcavacata di Rende (CS)

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una pianta ampiamente diffusa nell'area del bacino del Mediterraneo. I prodotti dell'olivo sono l'olio e le olive da tavola che apprezzati per le loro proprietà salutistiche e nutrizionali confermano un ruolo centrale nella dieta Mediterranea. Le cultivar d'olivo denominate 'Leucocarpa', conosciute anche con altri sinonimi, rappresentano un gruppo di varietà di olivo osservata per la prima volta alla fine del XIX secolo. Tale varietà sono caratterizzate dalla produzione di drupe che, a completa maturazione, si presentano del colore biancastro anziché nero-violaceo a causa di un blocco nella produzione di antociani. Nel corso dell'ultimo decennio lo sviluppo di tutta una serie di approcci molecolari nel campo della genomica funzionale ha permesso di associare sequenze genomiche caratterizzate a specifici caratteri fenotipici. In particolare, con l'avvento delle tecnologie di sequenziamento del DNA di ultima generazione (Illumina e 454), sequenze complete o parziali di cDNA con le corrispettive EST sono risultate essere fondamentali per aumentare la risoluzione nel processo di annotazione dei principali genomi di piante come anche nel fornire informazioni sulla struttura dei geni, sui pattern espressivi e sulla quantificazione dei loro trascritti. Lo scopo di tale lavoro è stato quello di individuare i loci ed i corrispondenti pattern di espressione di specifici geni coinvolti nei principali cambiamenti fenotipici, quali per esempio quelli implicati nel pathway metabolico della biosintesi degli antociani, nonché annotarli computazionalmente mediante l'utilizzo dei principali software bioinformatici. Tale lavoro è stato condotto mediante la creazione di librerie a cDNA, costruite a partire da drupe prelevate da due genotipi di 'Leucocarpa' a differente stadio di maturazione. I risultati ottenuti forniscono un contributo nel ridurre il gap informativo presente sui principali processi metabolici legati soprattutto all'invasatura delle drupe.

Gianni 80: nuova cv di albicocco a maturazione precoce

Valter Nencetti¹, Elvio Bellini¹ e Francesco Calderoni²
valter.nencetti@unifi.it

¹ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze

² Vivai Calderoni, Solarolo (RA)

Ottenuta da incrocio controllato di Solaria x Aurora, effettuato nel 2000, Gianni 80 è stata valutata e selezionata a Faenza (RA) e diffusa nel 2013.

L'albero, di elevata produttività, ha vigoria media ed habitus regolare. La fioritura è abbondante, di epoca medio-precoce (inizia a metà marzo a Solarolo, Faenza); la differenziazione a fiore avviene su tutti i tipi di ramo. Autocompatibile o parzialmente autocompatibile. L'epoca di maturazione è precoce (+14 Aurora, 9 giugno a Solarolo, Faenza). I frutti sono molto attraenti, hanno pezzatura grossa (60,88 g), forma rotonda in sezione trasversale e rotondeggiante, un po' allungata, in quella longitudinale, simmetrica; la linea di sutura è poco profonda; la cavità peduncolare è mediamente profonda, l'apice è depresso con mucrone; la superficie è leggermente rugosa con buccia mediamente spessa, con leggero tomento, di colore arancio, con intensa sovraccolorazione porpora a macchia estesa su quasi tutta la superficie del frutto (90%); il nocciolo ha forma allungata. La polpa è arancio, succosa, aromatica e di ottimo sapore, con tessitura media e consistenza molto elevata (7,93 Kg), dolce (13,62° Brix), con acidità molto bassa (pH 3,23; acidità titolabile 14,5 meq/100g), spicca. Presenta una buona tenuta in pianta. Dopo un periodo di frigo-conservazione di 12 giorni, i frutti hanno mantenuto consistenza, aspetto e sapore.

Gianni 168: nuova cv di albicocco a maturazione extraprecoce

Valter Nencetti¹, Elvio Bellini¹ e Francesco Calderoni²
valter.nencetti@unifi.it

¹ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze

² Vivai Calderoni, Solarolo (RA)

Ottenuta da incrocio controllato di Solaria x Aurora, effettuato nel 2000, Gianni 168 è stata valutata e selezionata a Faenza (RA) e diffusa nel 2013. L'albero, di buona produttività, ha vigoria medio-elevata ed habitus regolare, tendenzialmente assurgente. La fioritura è abbondante, di epoca medio-precoce (inizia a metà marzo a Solarolo); la differenziazione a fiore avviene su tutti i tipi di ramo. Autoincompatibile, buon impollinatore Sweet Cot. L'epoca di maturazione è extra-precoce (+5 Aurora, 31 maggio a Solarolo). I frutti sono molto attraenti, hanno pezzatura molto grossa (72 g), forma ellittica in sezione trasversale ed ovata in quella longitudinale, simmetrica; la linea di sutura ha una media profondità; la cavità peduncolare è mediamente profonda, l'apice è depresso senza mucrone; la superficie è liscia con buccia leggermente tomentosa, sottile, di colore arancio, con sovraccolorazione porpora a macchia estesa dal 20 al 50% del frutto; il nocciolo ha forma ovata. La polpa è arancio, con tessitura fine e consistenza

molto elevata (7,84 Kg), dolce (14° Brix), con bassa acidità (pH 3,34; acidità titolabile 17,9 meq/100g), succosa e spicca. Il sapore, mediamente aromatico, è ottimo. Dopo un periodo di conservazione di 12 giorni i frutti sono sempre esteticamente apprezzabili, sodi e non presentano difetti.

Valutazione della variabilità genetica di alcune cultivar di nespolo del Giappone mediante SSRs e AFLP

Diego Padoan¹, Maria Luisa Badenes², Maria Antonetta Germanà¹ e Francesca Barone¹

diego.padoan@unipa.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università di Palermo

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia (Spagna)

Il nespolo del Giappone (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) è una specie appartenente alla famiglia delle Rosaceae che esiste nell'area mediterranea come coltivazione alternativa e di nicchia. In Italia, la nespolicoltura è concentrata soprattutto in Sicilia e più precisamente nell'area costiera del palermitano, dove le varietà maggiormente coltivate sono rappresentate da ecotipi locali o selezioni rurali derivanti da libera impollinazione. In un'ottica di miglioramento genetico della varietà e per aiutare la selezione, l'analisi della variabilità genetica è di importanza fondamentale. In questo lavoro, è stata analizzata la variabilità genetica di 20 varietà presenti all'interno di un campo di germoplasma in provincia di Palermo contenente le più comuni e maggiormente rappresentative cultivar all'interno dell'intero Mediterraneo. Inoltre, mediante l'utilizzo combinato dei marcatori molecolari, 16 SSR e 4 AFLPs, si è potuto valutare l'origine ancestrale delle più comuni cultivar utilizzate negli impianti fruttiferi, confermando l'origine cinese del nespolo e la sua introduzione in Europa soltanto nel 18° secolo come pianta prettamente ornamentale.

Effetti dello stress idrico su popolazioni di microRNA conservati e specifici in due diversi genotipi di vite

Chiara Pagliarani¹, Marco Incarbone¹, Claudio Forcato², Marco Vitali¹, Eleonora Logreco¹, Manuela Ferrero¹, Giorgio Valle² e Andrea Schubert¹

chiara.pagliarani@unito.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino

² Centro Ricerche Interdipartimentale Biotecnologie Innovative, Università di Padova

Nelle piante, i microRNA (miRNA) ricoprono un ruolo cruciale nella regolazione di geni coinvolti in processi fisiologici e di sviluppo e nella risposta agli stress. In questo

lavoro, sono stati studiati gli effetti dello stress idrico sulle popolazioni di miRNA presenti in tessuti di foglia e radice di due distinti genotipi di vite, *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon (CS) e il portinnesto M4 (*Vitis vinifera* X *Vitis berlandieri*). Un totale di 24 piante di CS e M4 è stato sottoposto ad un trattamento di stress idrico della durata di 10 giorni. Durante la prova, gli scambi gassosi (g_s) e il potenziale idrico fogliare (Ψ_{leaf}) sono stati misurati giornalmente sulle piante trattate e sulle piante irrigate, al fine di individuare il momento di massimo stress ideale per il campionamento ($g_s < 0.05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $\Psi_{leaf} \sim -1.4 \text{ MPa}$). Da tessuti di foglia (F) e radice (R) provenienti da piante in stress e da piante controllo di entrambi i genotipi, è stato estratto l'RNA a basso peso molecolare, impiegato per la preparazione di librerie di cDNA processate tramite sequenziamento SOLiD. I risultati di sequenziamento mostrano 105 miRNA con variazioni di espressione significative dipendenti dal trattamento o dal diverso genotipo. Di queste sequenze, 77 appartengono a miRNA conservati, mentre 28 sono state riconosciute come miRNA specifici di vite. Su alcuni miRNA conservati, tipicamente coinvolti nella risposta a stress abiotici (miR159, miR393, miR156 e miR396), e sui relativi trascritti bersaglio sono state validate le differenze di espressione mediante RT-qPCR. Altre analisi di espressione sono state condotte su 13 miRNA specifici, positivamente o negativamente modulati in presenza di stress o esclusivamente attivati in uno solo dei due genotipi considerati. Allo scopo di completare la caratterizzazione dei nuovi miRNA, si sono inoltre individuate le relative sequenze bersaglio tramite analisi bioinformatica e su queste sono in corso analisi di espressione e 5'RACE. Questo studio è finanziato dal progetto AGER-SERRES n° 2010-2105.

Clementine 'Angiulli' mutazione genetica spontanea dal Clementine 'Comune' a maturazione precoce dei frutti

Girolamo Russo

girolamo.russo@agr.uniba.it

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università di Bari "Aldo Moro"

Nel presente lavoro viene ripartata la valutazione di una nuova mutazione genetica del clementine 'Comune' chiamata clementine 'Angiulli', rinvenuta in agro di Massafra, in provincia di Taranto. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto le caratteristiche morfologiche e qualitative dei frutti della mutazione spontanea clementine 'Angiulli', con i frutti del clementine 'Comune' al fine di individuare i pregi e l'epoca di maturazione commerciale più idonea dei frutti. Sono state determinate, come da scheda pomologia ufficiale del CRA ex MIPAF, le caratteristiche di frutti e succo: colore della buccia, peso del frutto, diametri equatoriali e longitudinali, spessore della buccia, larghezza dell' asse carpellare, aperture e chiusura

dell'asse carpellare, numero di semi per frutto, colore della polpa, contenuto di succo, colore del succo, solidi solubili totali (Brix), acidità totale (acido citrico), pH e grado di maturazione misurato come rapporto solidi solubili totali/acidità. I frutti di entrambe le cultivars sono privi di semi e molto simili nella forma. Non ci sono differenze significative nello spessore della buccia e nel contenuto in succo. Il frutto dell' 'Angiulli' è più facile da sbucciare, rispetto al frutto del 'Comune' la buccia aderisce meno allo spicchio e non è spinescente. I dati di maturazione ($^{\circ}$ Brix/Acidità) mostrano che la clementine 'Angiulli' matura circa dieci giorni prima del 'Comune'. Il clementine 'Angiulli' mostra un colore della buccia più intenso ed uniforme rispetto alla 'Comune'. La crescita ed il vigore degli alberi di 'Angiulli' sono simili a quelli del clementine 'Comune'. Tutti i dati rilevati confermano che il clementine 'Angiulli' possiede tutti i requisiti per essere incluso nel gruppo delle clementine; questa nuova cultivar potrebbe essere sul mercato nel prossimo futuro per la sua maturazione anticipata rispetto al 'Comune', per la buona produttività e apirenia dei frutti.

Programma di miglioramento genetico del pesco per l'individuazione delle migliori selezioni con caratteri innovativi. Analisi dei dati pomologici e fenologici mediante 'Ranking Method'

Guido Cipriani, Massimo Terlizzi, Daniele Bevilacqua, Angelo Di Cintio, Teresa Rosato e Alisea Sartori
alisea.sartori@entecra.it

CRA-FRU, Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Il CRA-FRU ha come principali obiettivi del suo programma di miglioramento genetico per il pesco, la selezione di nuovi genotipi che possano competere con le migliori cultivar già presenti sul mercato e l'introduzione di nuove tipologie di pesche e nettarine a forma piatta e deantocianiche nella polpa e nell'epidermide. I dati pomologici, fenologici ed agronomici raccolti negli ultimi 25 anni, di 439 selezioni avanzate (289 pesche e 150 nettarine) sono stati confrontati con quelli di 214 cultivar (97 pesche, 101 nettarine, 12 piatte e 4 deantocianiche), grazie ad un'elaborazione di "Ranking Method" che ha permesso di assegnare ad ogni genotipo un punteggio e di poter quindi stilare una graduatoria. In un primo screening sono state considerate le seguenti caratteristiche: peso, forma e intensità di sovraccoloro, gusto, consistenza, simmetria del frutto, produttività e data di raccolta. Sono state escluse tutte le selezioni che avevano ottenuto un punteggio più basso rispetto alle cultivar di riferimento che maturavano in contemporanea, e tra quelle che avevano un punteggio uguale o superiore è stata selezionata la migliore. La valutazione delle accessioni più promettenti con nuovi caratteri è stata effettuata prendendo in considerazione delle caratteristiche specifiche per la tipologia di frutto: per la forma piatta l'assenza di cracking o

altri danni all'epidermide, il grado zuccherino, l'acidità e l'uniformità di pezzatura; per i frutti a polpa deantocianica, l'assenza di sovraccoloro, l'eventuale presenza di rosso sotto l'epidermide e in polpa, la tomentosità ed il gusto sub-acido. Una seconda classifica è stata così ottenuta. Questo metodo ha permesso di scartare più del 90% delle selezioni avanzate, individuando le migliori 11 pesche, 8 nettarine, 8 pesche piatte e 4 pesche e 1 nettarina deantocianica.

Attività a sostegno del risanamento e della valorizzazione commerciale di alcuni ecotipi locali di fagiolo comune in Sardegna

Marco Testa¹, Anna Barbara Pisanu¹, Antonella Sirigu¹, Marco Maxia¹, Rosaria Pintore¹, Stefano Loddo¹, Luisa Otgianu¹, Alessandra Sanna¹, Martino Muntoni¹, Marco Giovanni Todde², Monica Rodriguez³ e Giovanna Attene³

mtesta@agrisricerca.it

¹ *AGRIS Sardegna, DIRVE, Cagliari*

² *LAORE Sardegna, SUT Barbagia, Gavoi (NU)*

³ *CBV ex azienda "Surigheddu", Università di Sassari, Alghero (SS)*

In Sardegna sono coltivate negli orti familiari numerose accessioni locali di specie orticole. A sostegno della biodiversità a partire dal 2003 presso il CBV dell'Università degli Studi di Sassari è stato avviato un programma di ricerca volto al reperimento, collezionamento e caratterizzazione di germoplasma locale di fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris* L.). Dal 2010, nell'azienda sperimentale di Uta (CA) dell'agenzia AGRIS, è stata avviata un'attività di caratterizzazione fenotipica dell'intera collezione, conservata al CBV, composta da 136 accessioni. Nel 2011, allo scopo di verificare la presenza di patogeni trasmessi dal seme, sono stati saggiati tutti gli ecotipi presenti in collezione per individuare tre dei virus più comuni del fagiolo: *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e *Bean yellow mosaic necrosis virus* (BYMV). Per sostenere il progetto di recupero e valorizzazione del fagiolo promosso dal Comune di Tiana (NU) e da un'Associazione di produttori, nel 2012 sono state realizzate una serie di azioni: caratterizzazione fenotipica (27 descrittori indicati dal IPGRI di Roma) e agronomica delle 8 accessioni di fagiolo tradizionalmente coltivate a Tiana, alcune delle quali già caratterizzate molecularmente al CBV, analisi dei campioni di acqua utilizzata per l'irrigazione e dei terreni nei quali si realizzerà il progetto, controllo fitosanitario della produzione di seme ottenuta nel 2011 dai produttori che hanno aderito al progetto. Per il rilevamento dei virus è stata adottata la metodica immunoenzimatica DAS-ELISA. In totale sono stati saggiati 75 campioni provenienti da *bulk* di seme per ognuna delle 8 varietà. Le infezioni virali sono risultate elevate in tutti gli otto ecotipi. La percentuale media di piante infette

è stata superiore al 50%, e in alcuni casi è salita fino al 100%. E' stata inoltre segnalata la presenza frequente di altri patogeni trasmessi dal seme, quali i miceti *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium* sp.

Isolamento delle sequenze genomiche *FAD2* in olivo (*Olea europaea* L.)

Amelia Salimonti¹, Samanta Zelasco¹ e Sabrina Micali²
samanta.zelasco@entecra.it

¹ CRA-OLI, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)

² CRA-FRU, Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Uno dei fattori da cui dipende l'elevato valore nutrizionale e salutistico dell'olio di oliva è la peculiare composizione acidica. Un enzima chiave della via biosintetica dei lipidi è l'oleato desaturasi (*FAD2*) che catalizza la desaturazione dell'acido oleico in acido linoleico. In olivo sono stati recentemente isolati e caratterizzati due geni *OepFAD2-1* e *OepFAD2-2*, in particolare quest'ultimo è considerato uno dei principali geni candidati per l'accumulo di acido linoleico. L'espressione dei geni *FAD2* varia in relazione al genotipo e l'individuazione di marcatori funzionali su questi geni potrebbe avere implicazioni pratiche importanti per il breeding avanzato. In questo lavoro si riportano i risultati preliminari del clonaggio genomico dei due geni *FAD2*, finalizzato allo studio dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica e all'individuazione di nuove varianti alleliche. Il DNA è stato isolato da tessuto fogliare della cultivar Tunnulidda. Due coppie di primer specifici sono state disegnate alle estremità 5' e 3' delle sequenze cDNA full-length disponibili in banca dati, tali primer sono andati ad amplificare l'intera regione genomica di ciascun gene; è stato quindi utilizzato un approccio di "gene walking" mediante nested-PCR e sequenziamento diretto Sanger. I primer hanno amplificato l'intera regione genomica di ciascun gene producendo frammenti di 3040 e 3704 bp, rispettivamente. In entrambi i geni è stata riscontrata la presenza di due lunghe regioni introniche, di 1610 bp in *OepFAD2-1* e di 2265 bp in *OepFAD2-2*. La presenza di una lunga sequenza intronica nella regione 5'-UTR è stata riscontrata anche in altre specie e sembra avere un ruolo nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica. I nostri risultati preliminari confermano la presenza degli introni anche nei due geni *FAD2* di olivo analizzati, che posseggono una diversa struttura potenzialmente associabile ad un differente significato funzionale.

I microRNA e l'architettura delle piante di olivo

Marco Cirilli¹, Annalisa Giampetruzzi², Eleonora Frioni¹, Maria Saponari² e Rosario Muleo¹

muleo@unitus.it

¹ Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università della Tuscia, Viterbo

² Istituto di Virologia Vegetale, CNR UOS Bari and Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari "Aldo Moro"

Evidenze indicano che i fattori epigenetici controllano l'espressione genica. Tra essi i microRNA (miRNA) regolano la stabilità degli RNA messaggeri (mRNA) bersaglio e/o la sua traduzione in proteina. Ogni miRNA, membro di una famiglia multigenica, può regolare un numero discreto di geni. I miRNA sono un esteso vocabolario del sistema di memoria di una specie e controllano rapidamente trascrizione e traduzione, affinché le esperienze acquisite, nell'evoluzione della specie, siano attuate nelle risposte adattative. Per comprenderne il ruolo nella regolazione dello sviluppo abbiamo caratterizzato la popolazione di small-RNA (sRNA) di foglie, internodi e radici, in piante di Leccino (*wild type*, wt) e del suo mutante dwarf (LD). Due librerie di cDNA da tessuti fogliari sono state generate e sequenziate con la piattaforma Illumina HiScanSQ. Il totale di reads (15-35 nt) è stato di 6.016.575 per LD e di 4.465.570 per il wt. Nelle librerie, la dimensione degli sRNA più frequente era nella classe dei 21 e 24 nt; con un'equivalenza di 21 e 24 nt nel wt, ed una predominanza della classe dei 24 nt in LD (2:1 di 24/21 nt). Dall'analisi digitale dell'espressione differenziale il miR319 è risultato più espresso in LD, mentre il miR166 è risultato più espresso in wt. Con un BLAST locale sul genoma di olivo e diversi Olea ESTDB sono stati individuati i precursori dei miRNA (pre-miRNA e pri-miRNA), con 20 loci per i pre-miR319 e 17 loci per pre-miR166 presenti nel genoma. I CLUSTAL groups sono 7 per il pre-miR319 e 6 per il pre-miR166. L'analisi bioinformatica condotta ha identificato i putativi geni target: le famiglie dei geni TCP e bZIP class III. Le validazione con qRT-PCR confermano l'associazione dei miRNA al fenotipo della pianta. I risultati aprono la comprensione della regolazione dello sviluppo della pianta, importante per i sistemi colturali.

Si ringrazia il MiPAAF, progetto "OLEA-Genomica e Miglioramento genetico dell'olivo", per il parziale supporto finanziario.