

**RAPPORTO FINALE SUI RISULTATI DEL PROGETTO COMUNE DI RICERCA
FINAL REPORT ON RESULTS OF JOINT RESEARCH PROJECT**

<p>1. Accordo /Agreement</p> <p>CNR / CONICET</p> <p>anni/ years 2011-2012</p>	
<p>2. Titolo del progetto</p> <p>Ibridi interspecifici in <i>Lotus</i> spp.: nuovo materiale per il miglioramento genetico e per l'identificazione di geni per la sintesi di proantocianidine e resistenza al sale in leguminose"</p> <p>2. Title of the project</p> <p>"<i>Lotus</i> interspecific hybrids: a new material to breed new varieties and clone genes involved in proanthocyanidin biosynthesis and salt tolerance in legumes"</p>	
<p>Parole chiave (massimo 3) Proantocianidine, stress salino, leguminose foraggere Key words (max. 3) Proanthocyanidins, saline stress, forage legumes</p>	
<p>(solo per parte italiana) Area scientifica / Scientific area (tabella 1/ table1) Dipartimento Agroalimentare</p>	
<p>3. Responsabili del progetto Project leaders</p>	
<p>Responsabile italiano</p> <p>Francesco Paolucci</p>	<p>Argentinean project leader</p> <p>Oscar Adolfo Ruiz</p>
<p>istituto di appartenenza</p> <p>Istituto di Genetica Vegetale- UOS Perugia</p> <p>Indirizzo Via Madonna Alta, 130 06128 Perugia</p>	<p>affiliation</p> <p>Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH).</p> <p>address Camino de Circunvalación de la Laguna Km 5, Casilla de Correo 164 (B7130IWA). Buenos Aires. Argentina</p>

4. Obiettivi del progetto

1) Miglioramento genetico di *Lous tenuis* (Lt) mediante re-incrocio con ibridi interspecifici *Lotus corniculatus* x *L tenuis* portatori di caratteri utili.

Ibridi interspecifici *Lotus corniculatus* (Lc) x *L tenuis* (Lt) sono stati precedentemente prodotti incrociando piante di una varietà di Lt largamente coltivata in Argentina, con piante di una popolazione naturale diploide di *Lotus corniculatus* ricche in PA e resistenti al sale reperita in Spagna. Poiché Lt è una specie non in grado di accumulare livelli agronomicamente utili di PA nelle foglie, gli ibridi interspecifici (LH) ottenuti saranno reincrociati con Lt per testare la possibilità di trasferire questo tratto nei tessuti eduli di Lt.

2) Produzione e valutazione di una popolazione segregante.

Al fine di produrre una generazione segregante per i caratteri resistenza al sale e capacità di accumulo di PA nei tessuti eduli, gli ibridi interspecifici F1 prodotti (50) saranno re-incrociati e la progenie valutata per l'accumulo e l'espressione di geni relativi alla sintesi di PAs e per la capacità di resistere a stress salino. Saranno selezionate infine le linee con i caratteri più divergenti tra loro sia per la resistenza al sale che per la sintesi di PA per analisi molecolari.

3) Valutazione funzionale di un gene candidate alla regolazione positiva della sintesi di PA nelle leguminose.

Verrà amplificata da RNA di foglie del parentale Lc ricco di PA l'intera sequenza codificante di un gene *R2R3MYB* di Lotus denominato *TT2b* la cui espressione correla con la sintesi di PA nei due parentali e negli ibridi interspecifici F1; la stessa verrà clonata in un vettore di espressione sotto il controllo del promotore costitutivo 35S per la trasformazione di specie modello via *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*. La capacità di accumulo di PA verrà quindi valutata nelle hairy roots e/o nelle piante transgeniche prodotte.

4. Aims of the project

1) Improving *Lotus tenuis* (Lt) varieties using interspecific hybrids as donor of useful traits.

Lotus corniculatus(Lc) x *L. tenuis* (Lt) hybrid lines (LH) were previously obtained through controlled pollination between plants belonging to a diploid, wild and PA-rich accession of *Lotus corniculatus* recovered from saline area in Spain, and plants from a commercial, highly productive *Lotus tenuis* (Lt) variety largely grown in South America. As Lt is a species that does accumulate proanthocyanidins (PAs) in leaves or stems to very low levels, the hybrid lines (LH) will be backcrossed to Lt and the progeny (BC1) will be evaluated for PA accumulation.

2) Production and evaluation of a segregating population.

To get insight into the genetic control of salt resistance and leaf PA traits in *Lotus*, the hybrids will be intercrossed to produce a segregating population (F2). The progeny lines will be evaluated for the content of leaf PAs and for their ability to growth under salt stress conditions. The F2 lines will be sorted according to the most divergent characters (i.e PA-rich vs PA-depleted lines, and salt tolerant vs salt susceptible lines) and nuclei acids isolated from lines with contrasting phenotypes for molecular analyses.

3) Functional evaluation of a candidate regulatory gene of PA in legumes .

The full length cDNA of the *R2R3MYB LcTT2* gene, whose expression correlates with the content of leaf PAs in *Lotus* spp. and with the expression of the key PA structural genes, will be isolated from *LcPD* and ectopically expressed in different *Lotus* and *Medicago* backgrounds. The resulting transgenic tissues and/or plants will be evaluated for the accumulation of PAs.

5. Risultati ottenuti per obiettivo (1 pagina)

1) Una popolazione BCK1 di 20 individui da backcross degli ibridi F1 verso il parentale senza PA Lt è stata prodotta ed analizzata per il contenuto di PA nelle foglie. Poiché il contenuto medio di PA in questa popolazione è risultato ben inferiore a quello ritenuto necessario per aumentare la digeribilità del foraggio di leguminose (5 mg/ g DW) si è ritenuto necessario perseguire una via alternativa per produrre linee di Lotus con livelli prossimi a quelli ottimali. Nello specifico, gli ibridi F1 sono stati re-incrociati con il parentale Lc ed in questo caso l'accumulo medio di PA nelle progenie è raddoppiato rispetto a quello degli ibridi iniziali ($10,62 \pm 1$ mg/g DM vs $5,2 \pm 0,68$ DM). Gli individui da questa nuova popolazione BCK1 costituiscono quindi materiale di potenziale da essere utilizzato come donatore del tratto genetico per la produzione di PA in Lt.

2) Una popolazione segregante costituita da 200 individui è stata ottenuta mediante incrocio di 50 ibridi F1. Ciascuna di questa 200 linee è stata valutata per l'accumulo di PA nelle foglie attraverso una colorazione-istochimica specifica e tutti gli individui classificati in 10 gruppi in base al pattern di accumulo di questi metaboliti. Quindi sono stati selezionati 10 individui per la classe con livelli più bassi di PA e 10 per quella con i livelli più alti. Gli stessi sono stati propagati mediante talee e saggiati per quantificare i PA accumulati nelle foglie e negli steli per via spettrofotometrica. Analisi di qRT-PCR sono state quindi fatte per saggiare i livelli di espressione dei geni candidati strutturali e dei regolatori della sintesi di PA nei parentali e negli individui selezionati della popolazione F1 e F2. I livelli dei trascritti dei geni *DFR*, *ANR*, *ANS*, *LARI*, *TT2b*, ma non quelli dei geni *PAL*, *CHS*, *TT2a/c* e del gene *HLH TANI* sono risultati correlare in maniera significativa con il livello totale di PA nelle foglie e negli steli del materiale investigato.

Inoltre, 50 linee F2 sono state impiegate insieme alle linee parentali e a 4 linee ibride F1 per allestire una prova sperimentale nel campo sperimentale presso l'unità argentina caratterizzato da suolo salino ed alcalino. La valutazione della produzione totale di foraggio e la persistenza di ciascuna linea è tuttora in corso.

3) Sono state ottenute mediante trasformazione genetica con *Agrobacterium rhizogenes* hairy roots di *Medicago truncatula* e *M sativa* transgeniche per *TT2b*. L'espressione di *TT2b* nelle hairy roots di queste specie ha indotto un accumulo di antociani ma non di PAs. Al contempo, il gene *TT2b* è stato usato anche per trasformare mediante *A tumefaciens* la specie modello tabacco per verificare se la sua espressione induce accumulo di PAs. Analisi colorimetriche PA specifiche condotte su foglie, radici e fiori di 10 linee transgeniche primarie (To) non hanno mostrato un accumulo differenziale di PAs nei transgenici rispetto a piante controllo non trasformate o trasformate con il gene reporter GUS. Tuttavia il transgene era correttamente espresso in tutte. Analisi più sensibili e mirate (ad esempio HPLC MS/MS) sono pertanto in corso per capire se l'espressione ectopica di *TT2b* è sufficiente o meno ad indurre *ex novo* la sintesi di PAs in leguminose ed in tabacco.

5. Achieved results (one page)

1) A BCK1 population consisting of 20 individuals has been produced by backcrossing hybrid plants to Lt. As the average accumulation of leaf PAs in this population was lower than the levels reported to be sufficient to improve the digestibility of forage legumes in ruminants (> 5 mg/ g DW), the alternative strategy to backcross F1 to the parental line Lc was pursued. Indeed, this resulting population showed PA levels higher than those considered as optimal for animal nutrition and twice as much than F1 (10,62 ± 1 mg/g DM vs 5,2 ± 0,68 DM). Individuals of this BCK1 population can thus be successfully used as donor material to Lt.

2) A F2 population consisting of 200 individuals has been generated by freely inter-crossing hybrid F1 plants. Each F2 line has been evaluated for the accumulation of leaf PA by DMACA staining and all individuals sorted into 10 classes according to the pattern of leaf PA accumulation. Ten individuals for both the class showing the lowest (0.56 ± 0.4 mg PAs/g DW) and the highest (7.12 ± 2.8 mg PAs/g DW) levels of leaf PAs were then in vivo propagated. qRT-PCR analyses have then been carried out to analyse the expression levels of a number of candidate PA structural and regulatory genes in parental and selected F1 hybrids and F2 lines. The transcript levels of *DFR*, *ANR*, *ANS*, *LARI*, *TT2b*, but not those relative to *PAL*, *CHS*, *TT2a/c* and the *HLH* gene *TAN1* highly correlated with the total amount of leaf PAs. Finally, a field trial has been set by outplanting in a saline-rich and alkaline soil in Argentina cuttings of 50 F2 lines along with parental and hybrid lines to select the most saline and saline-alkaline tolerant genotypes. Forage yield and plant persistence is under evaluation.

3) Transgenic *Medicago truncatula* and *M sativa* hairy roots overexpressing the *Lotus* gene *TT2b* have been obtained by *A rhizogenes* infection. Interestingly, the ectopic expression of this genes promoted the accumulation of anthocyanins but not PAs. Furthermore, the same gene was ectopically expressed in tobacco via *A tumefaciens*. Ten independent transgenic tobacco lines were regenerated and screened for the accumulation of PAs in flowers, stems, leaves and roots. Although the transgene was correctly expressed no PAs were detected as per PA-specific tissue staining. However, more sensible, targeted metabolic analyses (i.e HPLC MS/MS) are ongoing to test whether or not the expression of *TT2b* is sufficient to *de novo* promote the synthesis of PAs.

6. Prodotti del progetto / Results obtained

	n./no.
Publicaz. scient. su riviste internaz./ scientific publications on international reviews con IF----- senza IF	
Publicaz. in atti congressi internaz./ publications in international congress proceedings	1 ^a
Publicazioni in atti congressi nazionali / publications in national congress proceedings	3 ^b
Publicazione libri nazionali / Publication of national books	
Publicazione libri internazionali / Publication of international books	
Altre pubblicazioni / other publications	
Brevetti / Patents	
Prototipi / Prototypes	
Strumentazione / Equipment and /or Devices	
Programmi software / Software	
Banche dati / Data bases	**

Protocolli / Protocols	
Nuovi Materiali / New Materials	3 ^c
Nuovi processi / New processes	
Cataloghi/inventari/repertori / Catalogues/Inventories	
Atlanti/Carte/Mappe / Atlases/Charts/Maps	
Progetti di ricerca / Reserch project	1 ^d
Trasferimento innovazioni / Knowledge transfer	
Laboratori congiunti / Joint laboratories	
Alta formazione / Training	
Altro / Other	***

7. Informazioni dettagliate sui risultati indicati sub 6

^a Pubblicazioni in atti congressi internazionali

1) Francisco Escaray, Francesco Paolocci, Pedro Carrasco, Secundino Del Valle, Fernando Pieckenstain and Oscar A. Ruiz (2010). Inter-specific cross improves forage value and saline tolerance in the genus *Lotus*. International Network of Plant Abiotic Stress (INPAS) 3rd meeting 1, Valencia, Spain, 26th-27th May, 2010.

^b Pubblicazioni in atti congressi nazionali

1) Passeri V, Escaray FJ, Antonelli C, Damiani F, Ruiz OA, Paolocci F.(2012). Interspecific hybridization in the *Lotus* genus to build forage varieties with enhanced nutritional value: molecular and functional evidences. Italian Society of Plant Genetics Annual 56° Congress, Perugia, 17-20 Settembre 2012.)

2) Damiani F, Passeri V, Escaray FJ, Paolocci F (2011). Interference of LAR genes depletes the synthesis of proanthocyanidins in *Lotus corniculatus* leaves. Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA Assisi, Italy – 19/22 September, 2011.

3) Escaray FJ, Passeri V, Paolocci F, Pieckenstain FL, Ruiz OA. (2010). Regulación genética de taninos condensados en el género *Lotus*. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV), pag 157, La Plata 26-29 Septiembre 2010.

** Sono stati clonati e sequenziati cDNA e/o sequenze genomiche relative a geni chiave strutturali (es. *PAL*, *CHS*, *DFR*, *ANS*, *ANR*, *LARI*, *LAR2*) e regolatori (*TT2b*, *TT2a*, *TT2c*, *TANI*, *TT8*) della sintesi dei in *Lotus corniculatus* e *L. tenuis*. Le stesse saranno depositate in GenBank prima della sottomissione del manoscritto (in corso di preparazione) ad una rivista internazionale con IF.

^c Nuovi Materiali

E' stata prodotta una popolazione F2 segregante per i tratti biosintesi dei PAS e resistenza al sale (sotto investigazione) e due popolazioni di backcross tra gli ibridi interspecifici F1 ed i relativi parentali. Questo materiale vegetale è di interesse per le ditte sementiere per il breeding di nuove varietà di *Lotus*

^d Progetti di ricerca

Maggio 2011: Progetto annuale co-finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia" titolo: "Genomica e metabolomica in specie vegetali fortificate per l'accumulo di metaboliti" secondari" responsabile Dr Francesco Paolocci. Budget totale euro 30.000.

*** E' in corso di preparazione un manoscritto che sarà sottomesso ad una rivista scientifica internazionale con IF prima della fine del presente progetto (Dicembre 2012). Titolo provvisorio del lavoro "Lotus tenuis x L. corniculatus interspecific hybrids to breed bloating safe pastures and gain insight into the genetic control of proanthocyanidin biosynthesis in legumes" autori: Escaray FJ, V. Passeri, Babuin, M. F., Carrasco, P., Pieckenstain, FL, Damiani F, Paolocci F., Ruiz OA.

7. Detailed information on results indicated under point 6

^a Publications in international congress proceedings

1) Francisco Escaray, Francesco Paolocci, Pedro Carrasco, Secundino Del Valle, Fernando Pieckenstain and Oscar A. Ruiz (2010). Inter-specific cross improves forage value and saline tolerance in the genus *Lotus*. International Network of Plant Abiotic Stress (INPAS) 3rd meeting 1, Valencia, Spain, 26th-27th May, 2010.

^b Publications in national congress proceedings

1) Passeri V, Escaray FJ, Antonelli C, Damiani F, Ruiz OA, Paolocci F.(2012). Interspecific hybridization in the *Lotus* genus to build forage varieties with enhanced nutritional value: molecular and functional evidences. Italian Society of Plant Genetics Annual 56° Congress, Perugia, 17-20 Settembre 2012.)

2) Damiani F, Passeri V, Escary FJ, Paolocci F (2011). Interference of LAR genes dpletes the synthesis of proanthocyanidins in *Lotus corniculatus* leaves. Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA Assisi, Italy – 19/22 September, 2011.

3) Escaray FJ, Passeri V, Paolocci F, Pieckenstain FL, Ruiz OA. (2010). Regulación genética de taninos condensados en el género *Lotus*. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV), pag 157, La Plata 26-29 Septiembre 2010.

** cDNA and/or genomic sequences relative to the structural (i.e. *PAL*, *CHS*, *DFR*, *ANS*, *ANR*, *LARI*, *LAR2*) and regulatory genes (*TT2b*, *TT2a*, *TT2c*, *TANI*, *TT8*) of the PAS pathways have been cloned in *Lotus corniculatus* and *L tenuis*. These sequences will be deposited to GenBank before the submission of the manuscript (in preparation) to an international journal with IF.

^c New Materials

A segregating F2 population for the traits “accumulation of PAs in the foliage” and “saline tolerance” (currently under investigation) has been produced. Additionally, two populations resulting from the backcross of the interspecific hibrids (F1) to each of the two parents have been produced. This plant material is of outstanding interest for seed companies to breed superior *Lotus* variety.

^d Research project

May 2011. Annual project “Genomics and metabolomis in plant species improved for the accumulation of metabolites” co-sponsored by Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia. Project leader Dr Francesco Paolocci. Total budget euro 30.000.

*** A manuscript is in preparation and it will be submitted before the end of this project (December 2012) to a international scientific journal with IF. Its presumptive title is “*Lotus tenuis* x *L. corniculatus* interspecific hybrids to breed bloating safe pastures and gain insight into the genetic control of proanthocyanidin biosynthesis in legumes” by Escaray FJ, V. Passeri, Babuin, M. F., Carrasco, P., Pieckenstain, FL, Damiani F, Paolocci F., Ruiz OA.

8. Formazione di giovani ricercatori Training of young researchers

Questo progetto bilaterale ha contribuito in maniera sostanziale alla formazione di giovani ricercatori e studenti di dottorato. In particolare, il Dr Francisco Escaray ha svolto in questi due anni due periodi di ricerca/formazione, ciascuno di mese, presso il CNR-IGV dove non solo ha acquisito familiarità con le tecniche di base di biologia molecolare (come ad esempio il clonaggio genico e studio dell'espressione genica mediante analisi di qRT-PCR) ma anche potuto svolgere numerosi esperimenti che sono stati poi inclusi nella sua tesi di dottorato.

Delle conoscenze prodotte e del materiale ottenuto ne beneficeranno anche altre studenti (almeno tre) di dottorato argentini, le cui tesi vertono intorno al miglioramento genetico delle leguminose foraggere per vari tratti quali-quantitativi.

D'altra parte grazie a questo progetto la post doc italiana Dr.ssa Valewnti Passeri ha potuto acquisire familiarità con le analisi quali-quantitative dei pigmenti accumulati in pianta e con le metodiche e problematiche relative al miglioramento genetico di leguminose foraggere per la resa e l'incremento del valore nutrizionale.

This bilateral project made it possible the training of young students and researchers. More specifically, it allowed the Argentinean PhD student Francisco Escaray to acquire familiarity with basic techniques and methods necessary to clone genes and perform transcriptional analysis by qRT-PCR. Over the last two years Dr Escaray spent two months at CNR-IGV to carry out this collaborative research and his PhD thesis benefited from numerous molecular assessments carried out in collaboration between the two groups. In addition to this, it is expected that the wealth of knowledge and the plant material produced within the frame of this collaborative project will pave the way for the training of at least 3 more Argentinean PhD students. On the other hand, thanks to this collaborative project the Italian post-doc Dr.ssa Passeri acquired familiarity with quantitative and qualitative analyses of plant pigments and breeding approaches to improve yield and nutritional value in forage legumes.

9. Motivazione degli sviluppi della collaborazione negli anni successivi

(eventuali estensione ad altri paesi, collaborazioni multilaterali, contratti nazionali o internazionali)

Migliorare le proprietà nutrizionali e l'adattabilità a diversi ambienti pedoclimatici sono obiettivi prioritari del miglioramento genetico delle leguminose foraggere per far fronte, in maniera sostenibile sia dal punto di vista economico che ecologico, alla domanda di carne in costante aumento nel mondo. Nell'ambito del presente progetto sono state prodotte a) una popolazione segregante F2 ottenuta dall'incrocio di ibridi interspecifici F1 *Lotus corniculatus* x *L. tenuis*; b) due popolazioni backcross dal reinincrocio dei suddetti ibridi verso ciascuno dei parentali. Inoltre sono stati clonati ed identificati alcuni dei geni chiave della sintesi dei PA. Grazie ai materiali vegetali prodotti diventa ora possibile studiare a fondo nelle leguminose il controllo genetico sia della sintesi dei PA che della resistenza alla salinità. Inoltre, le linee prodotte serviranno come materiale di base per migliorare le varietà di *Lotus*, in particolare del *Lotus tenuis* che è tra le principali specie foraggere coltivate nel sud America, tramite approcci classici di breeding. Per dar seguito a tutto il lavoro finora svolto, i coordinatori del presente progetto non solo richiedono l'estensione dello stesso per gli anni 2013-2014, ma si stanno adoperando anche per costituire un network di laboratori europei e sudamericani per applicare a progetti internazionali, come ad esempio al progetto (i.e CEE KBBE.2013.3.1-02: EU-Latin America Partnering Initiative on sustainable biodiversity in agriculture).

Infine, il materiale prodotto permette ad entrambi gli Istituti di stabilire e/o rafforzare la collaborazione con ditte sementiere nazionali ed estere per il breeding di nuove varietà di *Lotus*.

9. Reasons for cooperative project developments in the following years, if any

(extension to other countries, multilateral collaboration, national or international contracts)

Breeding forage legumes to improve their nutritional value as well as their adaptability to different soil conditions are aims of outstanding relevance to produce meat safely and cheaply worldwide. The outputs of the present projects are: production of a F2 segregating population, two BCK1 populations (each one for each parental partner) as well as the identification and cloning of genes from *Lotus* spp related to PA biosynthesis. With this material in our hand it becomes now approachable studying the genetic control of PA biosynthesis and salt tolerance in legumes as well as the adoption of classical breeding schemes to improve *Lotus* species, such as *Lotus tenuis* largely grown all over South America. Thus, said that the coordinators of present projects are applying to the next CNR-CONICET call to support the extension of the present project for the years 2013-2014, they are also planning to create a network between European and south American institutions and apply to the next EU calls (i.e KBBE.2013.3.1-02: EU-Latin America Partnering Initiative on sustainable biodiversity in agriculture).

Further to this, the plant material obtained within the frame of the present collaborative project gives the two Institutions the opportunity to establish and reinforce the collaboration with seed companies to breed improved *Lotus* varieties.

Dr. Francesco Paolocci

(firma del responsabile
italiano del progetto)

Dr. OSCAR
Investigador Principal CONICET
Profesor Adjunto - UNSAM
IB INTECH - Unidad de Biotecnología 1

Dr. Oscar Adolfo Ruiz

(signature of the Argentinean project leader)

Dr. Domenico Pignone

(firma del direttore)

date: 27-09-2012

TABELLA 1

- | | |
|---|--|
| 1 – Dipartimento Terra e Ambiente | 7 – Dipartimento Materiali e Dispositivi |
| 2 – Dipartimento Energia e Trasporti | 8 – Dipartimento Sistemi di Produzione |
| 3 – Dipartimento Agroalimentare | 9 – Dipartimento Tecnologie dell'Informazione e
delle Comunicazioni |
| 4 – Dipartimento Medicina | 10 – Dipartimento Identità Culturale |
| 5 – Dipartimento Scienze della Vita | 11 – Dipartimento Patrimonio Culturale |
| 6 – Dipartimento Progettazione Molecolare | |