

**RELAZIONE SCIENTIFICA INERENTE IL PROGRAMMA DI RICERCA:**  
"SEQUENZIAMENTO COMPARATIVO DI DEIDRINE IN SPECIE DI QUERCE  
(*Comparative sequencing of dehydrin genes in oak species*)

Svolto da Silvia Fineschi presso: University of Göttingen, Section of Forest Genetics and Forest Tree Breeding nel periodo 4 Novembre 2008 – 25 Novembre 2008

L'obiettivo di questa ricerca era l'analisi di marcatori funzionali SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) correlati con la resistenza a stress da siccità in due specie di querce sempreverdi: *Quercus suber* e *Quercus ilex*.

Lo studio dei geni responsabili di tolleranze a fattori di stress, quali in questo caso la siccità, appare molto importante in questo particolare periodo caratterizzato da modificazioni climatiche stagionali di grande interesse, soprattutto in ambiente mediterraneo. Le specie forestali, organismi a lungo ciclo vitale, hanno subito nel corso della loro storia evolutiva notevoli modificazioni dell'habitat, a cui hanno risposto o con l'estinzione (locale o totale) o con l'adattamento alle modificazioni ambientali (milioni di anni di oscillazioni climatiche e millenni di pressione e di sfruttamento antropici). L'adattamento è un processo evolutivo molto lungo che si compie nello spazio di numerose generazioni.

La regione mediterranea, che è riconosciuta come uno dei maggiori centri di biodiversità vegetale a livello mondiale, è anche uno dei più fragili per avere subito, nel corso degli ultimi millenni, un forte impatto antropico. Attualmente i cambiamenti climatici sono ascrivibili, oltre alle naturali oscillazioni climatiche caratteristiche di ogni epoca, anche alle attività umane che interferiscono sempre più con gli equilibri ambientali. In questa ottica è importante identificare e studiare marcatori genetici di regioni espresse e il loro polimorfismo all'interno di popolazioni, di provenienze geografiche e in ultima analisi all'interno della stessa specie e tra specie diverse che condividono la stessa distribuzione geografica. In ambiente mediterraneo lo studio dei meccanismi che regolano la resistenza alla siccità è sicuramente di estremo interesse, come dimostra una vasta letteratura (ved. per es. Ingram e Bartels 1996; Seki *et al.* 2003).

*Quercus ilex*, leccio, e *Q. suber*, sughera, sono le due querce sempreverdi scelte per iniziare questa ricerca. Pur avendo esigenze ecologiche non coincidenti, condividono parte dell'areale: il Mediterraneo occidentale (penisola Iberica, Francia meridionale) e il Mediterraneo centrale (Provenza, penisola italiana, Sardegna, Sicilia, Corsica e isole minori). Leccio e sughera rappresentano importanti componenti dell'ecosistema mediterraneo e sono specie arboree destinate a occupare un areale sempre maggiore nello scenario che prevede lo spostamento verso nord delle specie vegetali quale conseguenza del riscaldamento globale.

Lo sviluppo di marcatori molecolari come SNPs ha creato l'opportunità di identificare geni candidati che controllano caratteri *target* e quindi di utilizzare il polimorfismo che si trova in condizioni di *linkage disequilibrium* con i caratteri fenotipici (Plomion *et al.* 2003, Neale e Savolainen, 2004).

La ricerca su *Quercus ilex* e *Q. suber* è stata iniziata a Göttingen grazie all'esperienza maturata dal gruppo di lavoro dell'istituto di genetica forestale su due specie di querce decidue, *Quercus petraea* e *Q. robur*.

L'obiettivo era rivolto allo studio di tre famiglie geniche di deidrine, (DHNs), che fanno parte di un grande gruppo di proteine idrofile conosciute come LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), e sono diffuse in quasi tutti i tessuti vegetali in numerosi gruppi di piante: piante superiori, alghe, lieviti e cianobatteri (Rorat 2006). In particolare le deidrine sono identificate come il gruppo II delle proteine LEA e sono comunemente indotte da stress

ambientali associati con le basse temperature e con la disidratazione (Ingram e Bartels 1996; Ismail *et al.* 1999; Rorat 2006). La caratteristica di tutte le deidrine è il segmento K di 15 amminoacidi (EKKGIMDKIKEKLP) altamente conservato. I geni che codificano per le deidrine sono famiglie ridondanti: ne sono state identificate sei in *Arabidopsis* (Puhakainen *et al.* 2004) e tredici in orzo (Choi *et al.* 1999; Rodriguez *et al.* 2005). Il fatto che le deidrine siano molto diffuse in diversi tessuti vegetali durante le fasi di accrescimento e in presenza di fattori di stress che conducono alla disidratazione cellulare, suggerisce che queste proteine abbiano un ruolo determinante nelle funzioni di sviluppo e di resistenza a fattori di stress. Non è però altrettanto chiaro come le differenti deidrine funzionino nei diversi tessuti durante l'accrescimento e la disidratazione cellulare (Rorat 2006).

Nell'ambito delle piante arboree, la ricerca sui geni che regolano la sintesi delle deidrine è ancora in una fase iniziale; alcuni studi sono stati svolti su varietà di *Prunus persica* (pesco) da Artlip (1997) e da Wisniewski *et al.* (2006), su *Betula pubescens* (betulla) da Welling *et al.* (2004), su *Picea glauca* da Richard (2000).

Sulle querce è in corso di conclusione il progetto europeo DIGENFOR (*Naturally Occurring Nucleotide Diversity in Candidate Genes for Forest Trees Adaptation*, informazioni sul sito: <http://www.pierroton.inra.fr/biogeco/genetique/projets/europe/digenfor/index.html>) che ha tra le sue finalità quella di convalidare SNPs di significato funzionale che associano la diversità nucleotidica alla variazione fenotipica di caratteri adattativi (resistenza a stress idrico) in due specie di interesse forestale: *Quercus robur* e *Pinus pinaster*.

Nel dettaglio la ricerca iniziata nel corso della Short Term Mobility è avanzata secondo le seguenti tappe:

- amplificazione del DNA di leccio e sughera con primer specifici di tre famiglie di geni delle deidrine (*Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3*);
- clonaggio dei frammenti di DNA amplificati
- sequenziamento dei frammenti di DNA clonati
- analisi delle sequenze mediante software specifici.

Il DNA era stato estratto precedentemente; le piante erano state scelte secondo uno schema sperimentale ben preciso. Il campione di DNA di sughera e leccio utilizzato per la ricerca rappresentava diverse provenienze geografiche delle due specie in modo da massimizzare la possibilità di trovare polimorfismi.

Lo schema del campionamento è illustrato in Fig. 1

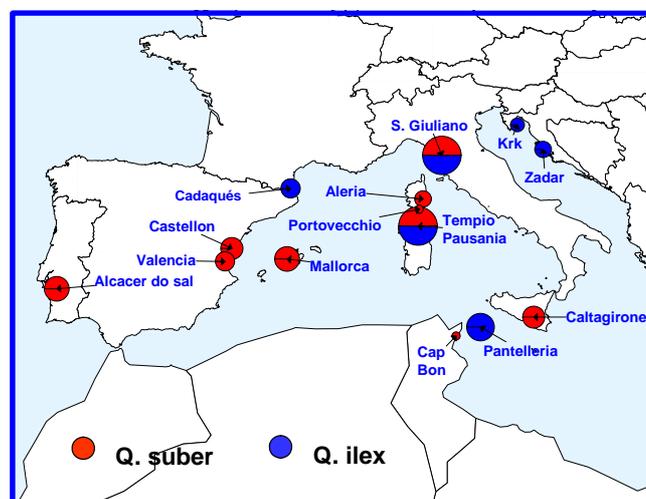


Fig. 1 Campionamento di *Q. suber* e *Q. ilex*

L'amplificazione del DNA è stato seguito tramite tecniche standard di PCR, utilizzando i primer specifici per *Q. robur* : *Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3* e *Dhn3*-promotor. (Il limitato tempo a disposizione ha consentito di sviluppare poi la ricerca solamente sugli amplificati di *Dhn3* e *Dhn3*-promotor).

I frammenti di DNA amplificati sono stati purificati e quindi clonati mediante il kit *TOPO TA Cloning* (Invitrogen).

Il sequenziamento dei frammenti clonati è stato ottenuto con la tecnica *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem) e per mezzo di un sequenziatore automatico capillare ABI 3100 (Applied Biosystem).

Le sequenze dei frammenti sono state analizzate ed editate con i software *Sequencing Analysis V 3.7* (Applied Biosystem) e *Codoncode Aligner V 1.6.3*.

Le sequenze sono state poi allineate con *BioEdit V. 5.09* con utilizzazione del software *ClustalW multiple alignment*.

Il primo risultato positivo ottenuto è stata la buona amplificazione del DNA di queste due specie di querce mediterranee con i primer che erano stati disegnati per due specie appartenenti a un diverso sottogenere *Quercus* (in Fig. 2 PCR con *Dhn3*). E' importante sottolineare che le specie considerate, pur appartenendo allo stesso genere sono rappresentanti di diversi sottogeneri, e quindi filogeneticamente non del tutto vicine tra loro: *Q. robur* e *Q. petraea* appartengono al sottogenere *Robur*, mentre *Q. suber* è inclusa nel sottogenere *Cerris* e *Q. ilex* nel sottogenere *Sclerophyllodrys*).

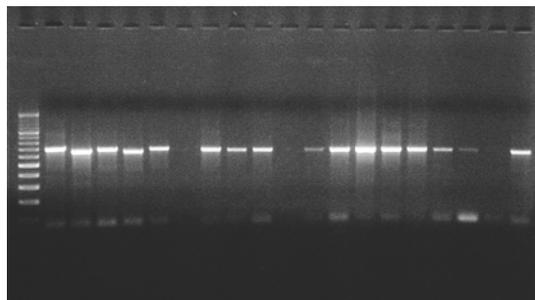


Fig. 2 Risultato di amplificazione del frammento *Dhn3* -promoter

Il secondo risultato importante è stato l'identificazione della regione del promotore (*Dhn3*-promotor) sia in sughera sia in leccio. In entrambi i casi le sequenze erano omologhe con quelle di *Q. robur* e di *Q. petraea* e da una prima analisi era possibile identificare differenze nucleotidiche (SNPs) tra provenienze geografiche diverse.

I dati ottenuti sono da considerarsi assolutamente preliminari. In ogni caso rappresentano le prime informazioni ottenute sui geni che controllano la sintesi delle deidrine in querce sempreverdi. E' opportuno continuare la ricerca in collaborazione con il gruppo di genetica forestale dell'Università di Göttingen al fine di identificare importanti polimorfismi nucleotidici (SNPs) e quindi nuovi marcatori di regioni espresse in questo gruppo di querce mediterranee.

Durante il periodo di soggiorno, la Dr.Fineschi ha seguito i seminari interni e ha partecipato alle riunioni di lavoro. Ha inoltre tenuto un seminario dal titolo: *Different effects of human impact on the distribution of diversity in Mediterranean tree species* nell'ambito

del programma invernale 2008-2009 dei 'Colloqui di Genetica Vegetale' (*Pflanzen-genetisches Kolloqium*) organizzati congiuntamente dalla Facoltà di Scienze Forestali e dalla Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Göttingen (ved. allegato).

Il Proponente del Programma  
Dr. Tullio Turchetti

Il Fruitore del Programma  
Dr. Silvia Fineschi

### Bibliografia

- Artlip TS, Callahan AM, Bassett CL, Wisniewski ME. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Molecular Biology* 33: 61–70, 1997. 61
- Choi DW, Zhu B, Close, TJ. 1999. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical Applied Genetics* 98, 1234-1247.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 47:377-403.
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ. 1999. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proceedings National Academy of Science USA* 96, 13566-13570.
- Neale DB and Savolainen O. 2004, Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science* 9, 325-330
- Plomion C, Cooke J, Richardson T, Mackay J, Tuskan G. 2003. Report on the forest trees workshop at the plant and animal genome conference. *Comparative and Functional Genomics* 4, 229-238
- Puhakainen T, Hess MV, Mäkela P, Svenson J, Heino P, Palva ET. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54, 743-753.
- Richard S, Morency MJ, Drevet C, Jouanin L, Séguin A. 2000. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology* 43: 1–10
- Rodriguez EM, Svenson JT, Malatrasi M, Choi DW, Close TJ. 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical Applied Genetics*. 110, 852-858.
- Rorat 2006 Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11, 536 - 556
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 194-199
- Welling A, Rinne P, Viherä-Aarnio A, Kontunen-Soppela S, Heino P, Tapio Palva E. 2004. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) *Journal of Experimental Botany*, 55, 507-516.
- Wisniewski ME, Bassett CL, Renaut J, Farrel R., Tworokski T, Artlip TS. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit *Tree Physiology* 26, 575–584