



RELAZIONE SCIENTIFICA STM 2015

Il proponente: MAURIZIO SATTIN

Il fruitore: SILVIA PANOZZO

Istituto di afferenza: Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale (IBAF), Assegnista

Dipartimento di afferenza: Dipartimento Terra e Ambiente

Istituzione ospitante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas de Lavoura, Porto Alegre, RS, Brasil

Titolo del programma: Analisi quantitativa dell'espressione del gene ALS in piante di *Echinochloa* spp. resistenti o suscettibili ad erbicidi inibitori dell'enzima ALS.

Background: La resistenza agli erbicidi è un problema a livello mondiale che negli ultimi dieci anni ha visto un forte incremento anche in Italia, in particolare nelle zone dove monocoltura e scarsa rotazione di erbicidi con diverso meccanismo d'azione sono pratiche comuni. La linea guida principale del mio progetto di dottorato di ricerca (2009-2011), che sta proseguendo durante l'assegno di ricerca (dal 2012 ad oggi), è l'analisi multidisciplinare della resistenza agli erbicidi in infestanti poliploidi di colture estive allo scopo di ottenere informazioni utili per un uso più responsabile degli erbicidi e nuove indicazioni per la gestione della resistenza. In questo si inserisce lo studio delle basi molecolari della resistenza agli erbicidi inibitori dell'acetolattato sintasi (ALS) in *Echinochoa* spp., una delle principali e più invasive piante infestanti del riso in Italia (Tabacchi et al., 2006). A partire dal 2008, quando è stata confermata la prima popolazione di *Echinochloa* resistente agli inibitori dell'ALS in Italia, c'è stato un incremento esponenziale del numero di popolazioni resistenti. A questo si è aggiunta la resistenza multipla agli inibitori dell'ACCasi nel 2009 (GIRE, 2015). Considerando che i due meccanismi d'azione sono indispensabili per il riso, si evince che questo sistema colturale sta diventando insostenibile. L'attività di ricerca svolta fino ad oggi ha permesso di ottenere la prima sequenza del gene ALS di *Echinochloa* (Panozzo et al., 2013) e di identificare e clonare le due copie del gene ALS (ALS1 e ALS2) espresse nel genoma di *Echinochloa*. Si è inoltre trovato che il principale meccanismo di resistenza è di tipo target-site, dovuto cioè a una mutazione puntiforme nel gene ALS, e che solo una delle copie del gene (ALS1) è portatrice della mutazione (in posizione 574) conosciuta come causa delle resistenza agli erbicidi inibitori dell'ALS in altre specie (Tranel et al., 2015).

Obiettivi del programma: sviluppare un protocollo per determinare l'espressione del gene ALS in piante esaploidi di *Echinochloa* spp. con alti livelli di resistenza agli inibitori dell'ALS campionati in risaia in Italia utilizzando la real-time PCR. In particolare, si è voluto analizzare se esiste (1) un'espressione differenziale fra alleli resistenti (ALS1) e suscettibili



(ALS2) del gene ALS, (2) un'espressione differenziale del gene ALS in piante trattate con erbicida (T) e non trattate (NT) delle stesse popolazioni.

Attività svolta: sono state selezionate otto popolazioni di *Echinochloa* spp. fra quelle precedentemente campionate in riso in Italia e caratterizzate per la resistenza agli inibitori dell'ALS. In particolare, sono state utilizzate sei popolazioni resistenti con diversi pattern e livelli di resistenza (09-42L, 10-44acL, 10-44cL, 11-45L, 10-56L e 11-102) e due popolazioni suscettibili (07-16L e 14-161).

I semi di ogni popolazione sono stati scarificati con acido solforico e pre-germinati in camera di crescita a temperatura costante di 22°C. Dopo 6 giorni 20 piantine sono state trapiantate singolarmente in un substrato di terra e messe in serra a crescere fino al raggiungimento dello stadio di tre foglie. 10 piante per ogni popolazione sono state trattate con Ricer (penoxsulam 240 g L⁻¹) alla dose di 250 mL ha⁻¹. Dopo 24 ore dal trattamento sono stati campionati 50-100 mg di foglie di tre piante non trattate (NT) e di tre piante trattate (T) per ogni popolazione, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA. L'RNA totale è stato estratto utilizzando TRIzol (Simms et al., 1993), quantificato allo spettrofotometro e purificato con l'uso di DNasi I (Roche). Successivamente è stato sintetizzato il cDNA utilizzando la SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per l'analisi con la Real-time PCR sono state costruite due coppie di primer allele specifici per ognuna delle due copie del gene ALS identificate.

Sono stati eseguiti dei test preliminari utilizzando diluizioni seriali del template di cDNA (1:6,25; 1:25; 1:50 e 1:100) che hanno permesso di identificare la coppia di primer che amplificava nel modo migliore i due alleli ALS1 e ALS2. Successivamente sono stati testati su due popolazioni, una suscettibile e una resistente, otto geni di riferimento fra quelli messi a punto per la specie *Echinochloa* nel laboratorio di biologia molecolare dell'UFRGS. Queste analisi hanno permesso di identificare i due geni di riferimento che funzionavano meglio sulle popolazioni oggetto dello studio: Rubisco e 18S.

Il cDNA di tutte le piante, trattate e non trattate, è stato testato con la Real-time PCR per determinare l'espressione dei due geni di riferimento selezionati e l'espressione dei due alleli del gene ALS. La reazione, eseguita in piastre da 96 pozzetti e un volume finale di 20 µL per ogni pozzetto, prevedeva di mescolare i seguenti reagenti: PCR buffer 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs mix 0,25 mM, Forward e Reverse primers 0,2 µM, Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 0,5 U, SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain 1x (Invitrogen), ROX Reference Dye 0,2 µL (Invitrogen) e cDNA 30ng. Il programma di amplificazione, eseguito su uno strumento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem), prevedeva un primo stage di denaturazione a 95 °C per 5 min, 40 cicli di amplificazione a tre step (94 °C per 15 s, 60 °C per 10 s e 72 °C per 15 s) più un quarto dove lo strumento rileva la fluorescenza emessa ad ogni ciclo (60 °C per 35 s), e un stage di elongazione con due step a 95 °C per 15 s e 60 °C per 1 min, rispettivamente. I dati sono stati in un primo momento analizzati tramite il Sequence Detection Software (SDS) 1.4, e successivamente esportati in Excel per l'elaborazione col metodo del $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta C_t_{\text{calibrator}} = C_t_{\text{target}} - C_t_{\text{reference}} [1]$$



$$\Delta Ct_{\text{sample}} = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}} [2]$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{calibrator}} - \Delta Ct_{\text{sample}} [3]$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Relative quantity (RQ)} [4]$$

Risultati e sviluppi futuri:

Attraverso l'uso di geni di riferimento costitutivamente espressi nel genoma delle piante la Real-time PCR permette di determinare l'espressione relativa di geni di interesse. Il test di otto geni di riferimento (Rubisco, Actina, 18S, CAP, Tubuline, GADPH, EF1 e Ubiquitine) ha permesso di identificare i due che avevano un'espressione mediamente più elevata e specifica in tutti i campioni testati (Rubisco e 18S). In questo modo è stato creato un profilo di espressione robusto per l'analisi relativa dell'espressione del gene di interesse (ALS).

Un esempio dei profili di amplificazione e delle curve di dissociazione ottenuti per i due geni di riferimento presi in considerazione è riportato in Fig. 1.

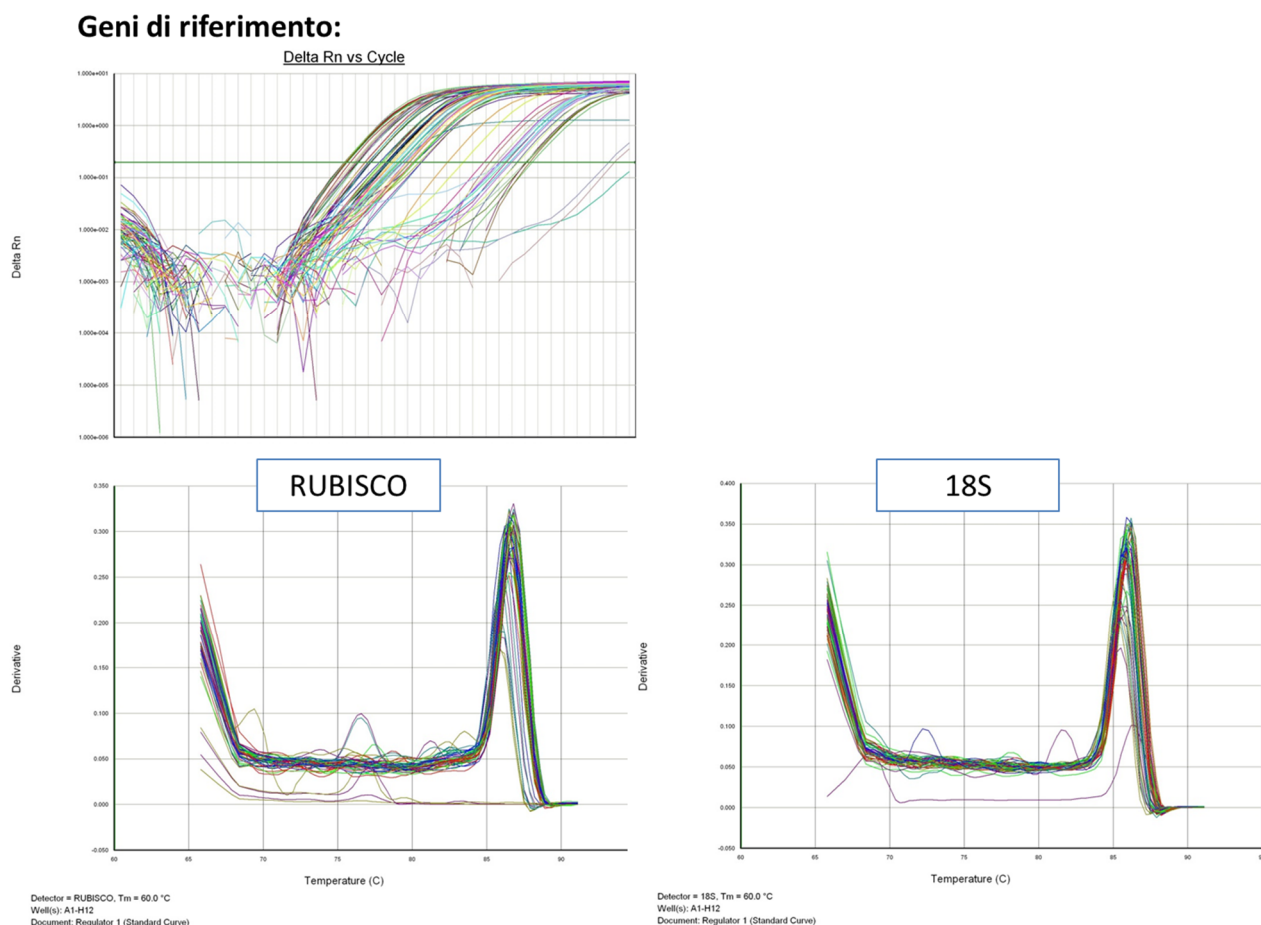


Fig. 1. Amplification Plot e Dissociation Curves per le due coppie di primer che amplificano i geni di riferimento Rubisco e 18S in due popolazioni di *Echinochloa* considerando sia piante trattate con erbicida che piante non trattate.



Dal grafico di amplificazione si può osservare come tutti i campioni vengano amplificati con alti livelli di template iniziale (curve con Ct minore nella parte sinistra del primo grafico), mentre sulla destra del grafico troviamo l'amplificazione dei controlli (NTC, non-target-control, contenente acqua). Dalle curve di dissociazione si può osservare che non ci sono prodotti di amplificazione aspecifici per entrambi i geni di riferimento considerati, infatti il picco di dissociazione è unico per tutti i campioni.

Per quel che riguarda il gene ALS, siccome lo scopo era di analizzare separatamente l'espressione dei due alleli di interesse del gene ALS, è stata determinata la coppia di primer allele-specifici che funzionava per ogni allele (ALS1 e ALS2), infatti alcuni dei primer costruiti non amplificavano il template. Anche in questo caso in Fig. 2 è riportato un esempio dei profili di amplificazione e delle curve di dissociazione.

Gene ALS:

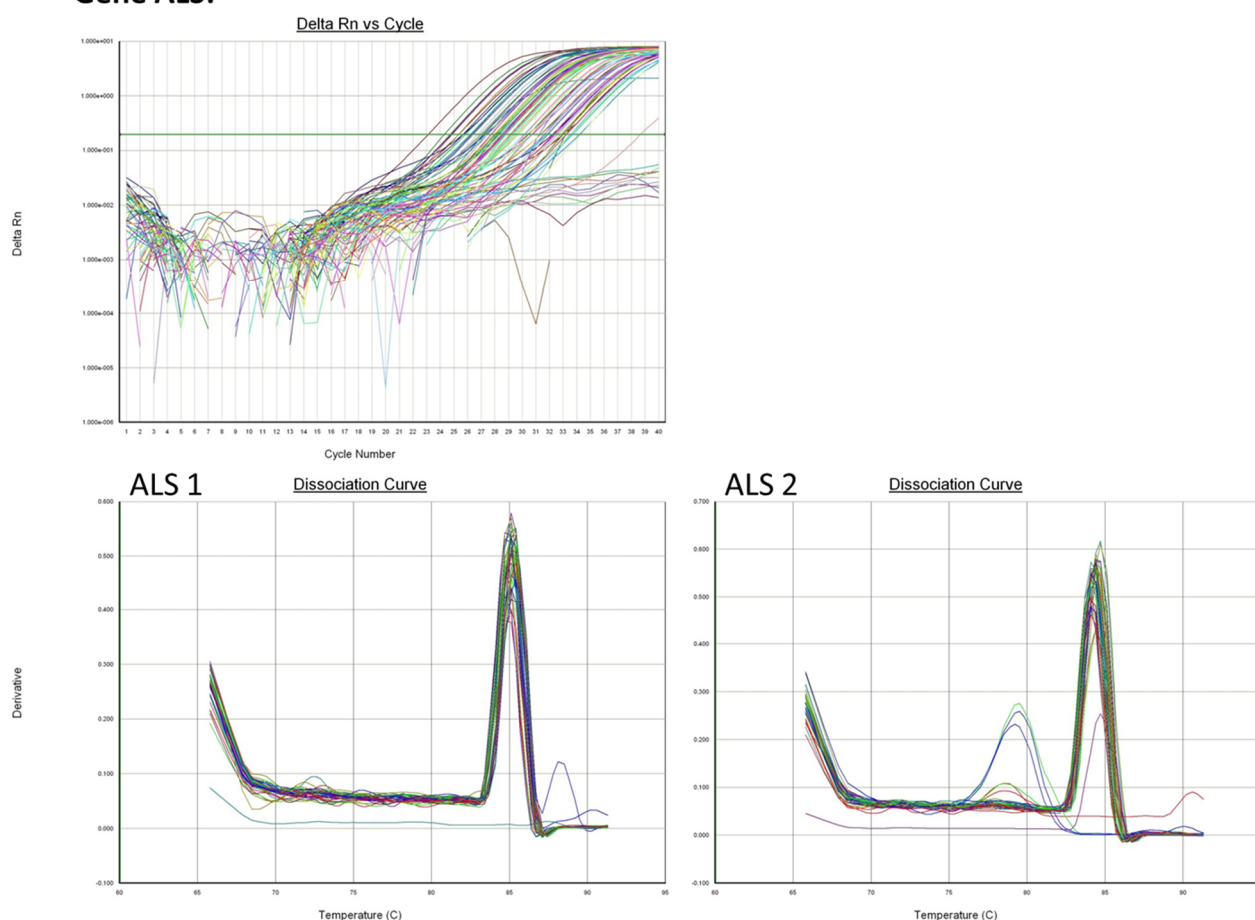


Fig. 2. Amplification Plot e Dissociation Curves per le due coppie di primer allele-specifici che amplificano ALS1 e ALS2 in due popolazioni di *Echinochloa* considerando sia piante trattate con erbicida che piante non trattate.

Il grafico di amplificazione mette chiaramente in evidenza quelli che sono i campioni contenenti il template di cDNA rispetto ai controlli NTC contenenti solo acqua usati come controlli negativi della reazione di amplificazione (curve sotto la threshold line, linea verde nel grafico). In questo caso si può osservare come ci siano dei picchi secondari sul grafico riguardante ALS2, questo indica che molto probabilmente i primer tendono a formare dei dimeri. Essendo il problema limitato solo ad alcuni campioni (infatti il picco secondario non



è presente in tutti i campioni), in questo caso il problema è stato superato eliminando i campioni che presentavano l'amplificazione anomala.

Il metodo del $\Delta\Delta C_t$ permette di quantificare in modo relativo (RQ, formula [4]) l'espressione di un gene di interesse (ALS1 e ALS2 nel nostro caso, formula [1]) rispetto ad un gene riferimento (Rubisco e 18S nel nostro caso, formule [1] e [2]) scegliendo come espressione base quella di un campione detto "Calibrator" (nel nostro caso il suscettibile non trattato, formula [2]). Avendo inserito nell'esperimento due popolazioni suscettibili (07-16L e 14-161), i dati sono stati elaborati usando come calibrator entrambe le popolazioni. I dati dei C_t (Threshold Cycle), cioè il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della linea soglia che interseca tutte le curve nella fase esponenziale, mostrano come le due popolazioni suscettibili si comportino in maniera leggermente diversa (Fig. 3), soprattutto se consideriamo i campioni non trattati (barre rosse). Mentre i valori di C_t sono comparabili per i campioni trattati (27 e 28, rispettivamente) e non ci sono differenze fra ALS1 e ALS2, i valori di C_t per i campioni non trattati sono superiori per la pop. 14-161, e sempre inferiori per ALS1 rispetto ad ALS2, indicando che l'espressione del primo è maggiore.

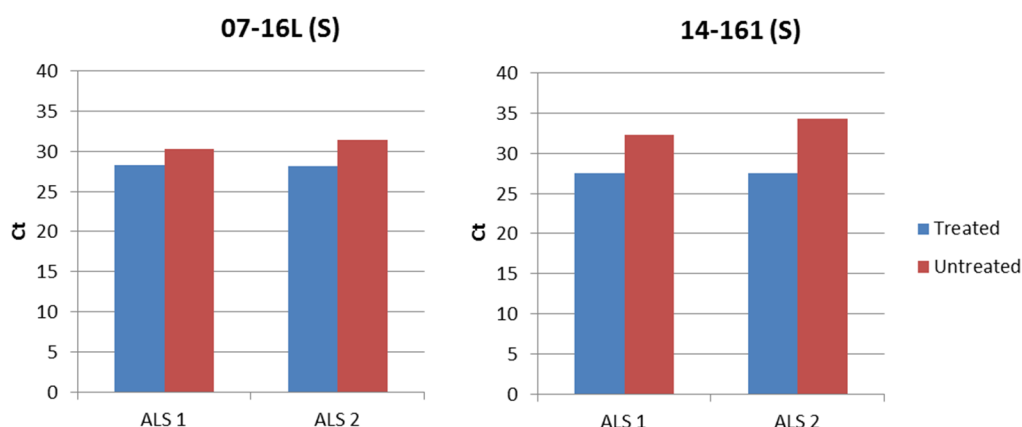


Fig. 3. C_t delle popolazioni suscettibili per i due alleli del gene ALS analizzati, nei campioni trattati con erbicida (barre blu) e non trattati (barre rosse)

Per le popolazioni resistenti i dati di espressione di ALS1 e ALS2 sono riportati in Fig. 4 e 5 considerando, rispettivamente, i due geni di riferimento Rubisco (Fig. 4) e 18S (Fig. 5) e i campioni non trattati delle due popolazioni suscettibili come Calibrator (07-16L sulla sinistra e 14-161 sulla destra delle Fig. 4 e 5, rispettivamente). Questo ha permesso di mettere in evidenza le differenze di espressione delle due copie di alleli. Infatti i risultati indicano che ALS1 è mediamente maggiormente espresso nelle cellule di *Echinochloa* rispetto a ALS2, sia nei campioni non trattati che nei campioni trattati. Questo è quello che ci si aspettava di osservare visti i risultati del clonaggio del gene ALS di questa specie dove era stato osservato che mediamente cloni contenenti la copia 1 del gene erano maggiormente presenti nella selezione casuale rispetto a cloni contenenti il gene 2. Tale risultato permette di ipotizzare che la maggior espressione di un allele rispetto all'altro fa sì che la probabilità di mutazione in quell'allele sia più alta, motivo per cui la mutazione che causa la resistenza è sempre presente in ALS1. Allo stesso tempo la maggior espressione della copia del gene contenente la mutazione potrebbe essere legata all'alto livello di



resistenza osservato in queste popolazioni facendo si che il principale, e probabilmente l'unico, meccanismo di resistenza sia proprio di tipo target-site.

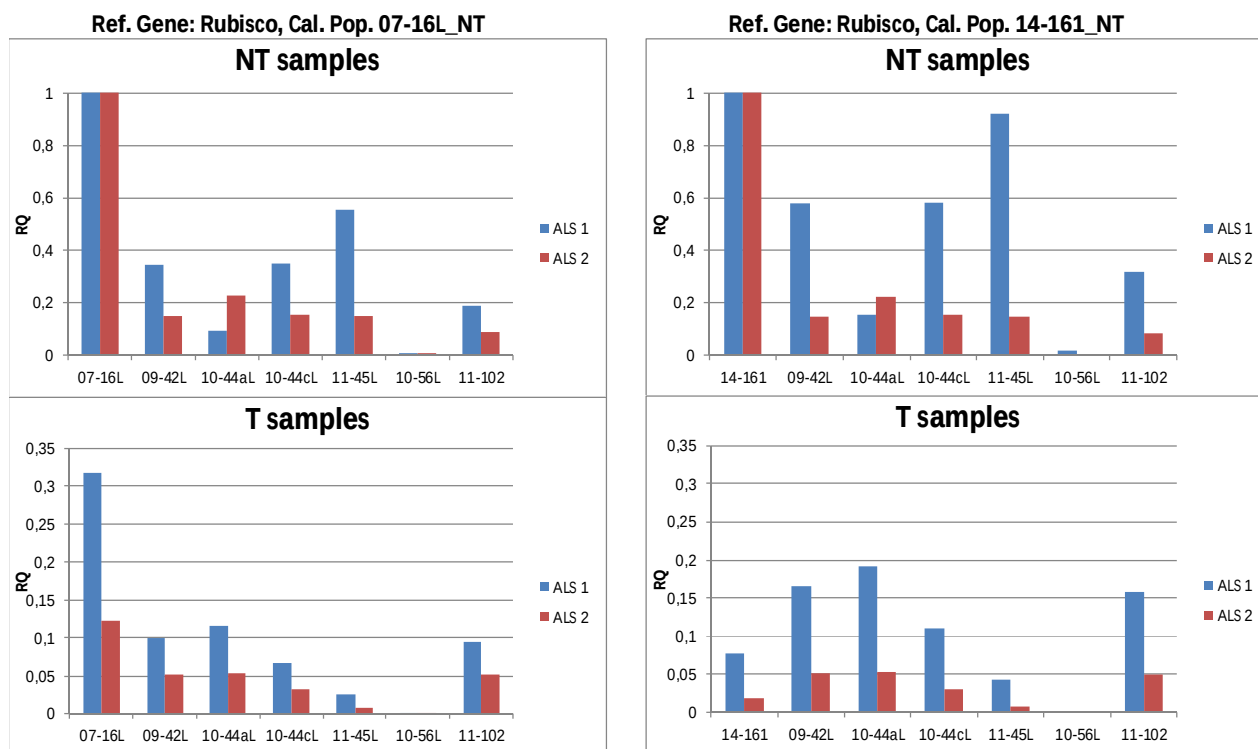


Fig. 4. Espressione relativa dei due alleli del gene ALS (ALS1 e ALS2) in campioni non trattati (NT) e trattati (T) di *Echinochloa* considerando come gene di riferimento Rubisco e come calibratore le due pop. S (07-16L sulla sinistra e 14-161 sulla destra).

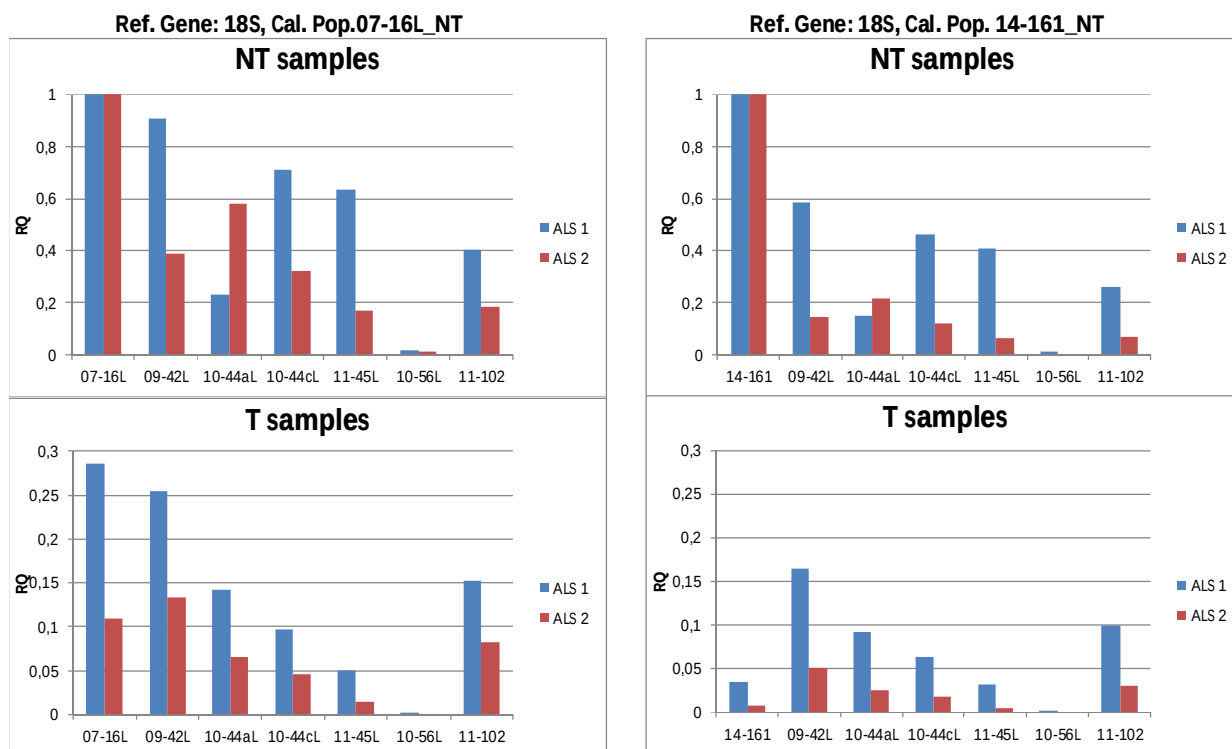


Fig. 5. Espressione relativa dei due alleli del gene ALS (ALS1 e ALS2) in campioni non trattati (NT) e trattati (T) di *Echinochloa* considerando come gene di riferimento 18S e come calibratore le due pop. S (07-16L sulla sinistra e 14-161 sulla destra).



Gli sviluppi di questo lavoro prevedono di completare le analisi aggiungendo un paio di popolazioni di specie diverse di *Echinochloa* rispetto a quelle analizzate per confermare che l'espressione differenziale osservata si confermi a livello inter-specie. Inoltre, la tecnica appresa sarà utile nel nostro laboratorio per approfondire le conoscenze sulla resistenza agli erbicidi anche in altre specie infestanti, sia a livello di resistenza target-site, come in questo caso, ma soprattutto per l'approfondimento della resistenza di tipo non-target-site, resistenza di tipo poligenico molto più complessa dal punto di vista dello studio a livello molecolare.

Bibliografia

- GIRE - Italian herbicide resistance working group (2015). Database of herbicide resistance in Italy. www.resistenzaerbicidi.it. Ultimo accesso 6 novembre 2015
- Panozzo S, Scarabel L, Tranel PJ, Sattin M (2013). Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105:93-101
- Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* 15:99-102
- Tabacchi M, Mantegazza R, Spada A, Ferrero A (2006). Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. *Weed Science* 54:1086-1093
- Tranel PJ, Wright TR, Heap IM (2015). Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online <http://www.weedscience.com>. 11/6/2015.

Firma del Fruitore

Silvia Panozzo