Spett.le
Ufficio Relazioni Internazionali
Consiglio Nazionale delle Ricerche
P.le Aldo Moro, 7
00185 Roma

Oggetto: Progetto Laboratori Congiunti Internazionali – Isolation of the genetic determinants of asexual seed production (apomixis) to maximise crop productivity- (Italia-Argentina).
RELAZIONE FINALE
Responsabile: Dr. Fulvio Pupilli

L'apomissia è una particolare forma di riproduzione che, nelle piante comporta le generazione per seme di individui geneticamente identici alla pianta madre. Le piante apomittiche generano cellule uovo a numero cromosomico somatico (apomeiosi) da cui si evolvono embrioni indipendentemente dalla fecondazione (partenogenesi) e, in molti casi endospermi in cui il canonico rapporto dei genomi parentali (2 materni : 1 paterno) è cambiato in 4(m):1(p). Qualora l'apomissia potesse essere introdotta nelle specie per cui è importante la produzione di seme ibrido (es. mais), sarebbe possibile riseminare il seme prodotto dagli ibridi F1 senza la perdita di vigore eterotico. I geni che controllano tale carattere sono tuttora sconosciuti. Il progetto di ricerca svolto in collaborazione con l' Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario del CONICET (IICAR-CONICET) (Argentina) si prefiggeva, come obiettivo generale, l'individuazione dei geni che controllano le diverse componenti dell'apomissia (aposporia, partenogenesi e sviluppo di endosperma sbilanciato) nella prospettiva di sviluppare una tecnologia di base volta alla produzione di seme clonale.

Attività 2016

Durante il corso del 2016 è stato caratterizzato in *Paspalum simplex* a livello strutturale e funzionale un omologo del gene che codifica la sub-unità N. 3 del complesso multi proteico denominato ORIGIN OF RECOGNITION COMPLEX (ORC) che, negli eucarioti, controlla la replicazione del DNA e la differenziazione cellulare. Sono state identificate tre copie ciascuna corrispondente a tre RNA messaggeri diversi. Una di queste era specificatamente presente nei genotipi apomittici. Dall'analisi della sequenza, il gene apomissia-specifico esprimeva un RNA che sulla base della presenza di molti codoni di STOP era incapace di essere tradotto in una proteina funzionale mentre uno degli altri due geni, comune ai due fenotipi riproduttivi esprimeva un RNA che virtualmente poteva essere tradotto in una proteina funzionale. Il terzo gene che segregava

indipendentemente dall'apomissia codificava per una proteina troncata di 138 aminoacidi. In base alla mappatura comparativa, è stato visto che il gene *PsORC3* presentava almeno un allele co-segregante con l'apomissia in tre specie appartenenti al genere *Paspalum* indicando che tale gene si trova posizionato sulla parte del locus dell'apomissia che è conservato in diverse specie apomittiche appartenenti allo stesso genere e che quindi dovrebbe costituire uno dei determinanti genetici indispensabili per l'espressione del carattere. L'analisi dell'espressione è stata condotta per RealTime PCR per seguire, nell'arco di tempo dello sviluppo fiorale che comprende l'evoluzione del seme apomittico (da 5 giorni prima a 10 giorni dopo l'antesi), l'espressione di ciascuno dei tre geni. E' stato visto che il gene specifico dell'apomissia si esprimeva in maniera costitutiva e a bassi livelli in tutti gli stadi di sviluppo considerati. Il gene "funzionale" rimane pressoché silente in tutti gli stadi pre-antesi mentre aumenta sensibilmente la sua espressione negli stadi successivi nei genotipi sessuali. Diversamente, nei genotipi apomittici lo stesso gene si manteneva silente anche dopo l'antesi. L'analisi dell'espressione *in situ* (condotta in Argentina), mostrava che nei sessuali *PsORC3* si esprimeva nei nuclei polari e nell'endosperma come mRNA "senso" mentre lo stesso gene si esprimeva anche come "antisenso" nei nuclei polari degli apomittici. Il risultato più eclatante era che negli apomittici l'intenso segnale di ibridazione notato nell'endosperma dei sessuali era completamente assente. Questo fatto indicava che negli apomittici *PsORC3* era silenziato con un meccanismo di senso/antisenso proprio nell'organo dove si esprimeva maggiormente nei sessuali. Per ipotizzare la possibile funzione di *PsORC3* nell'apomissia è stato analizzato il fenotipo riproduttivo di mutanti di Arabidopsis e riso per il gene in questione. In particolare è stato visto che tali mutanti risultavano essere femmina-sterili quando la mutazione era in stato omozigote e che tale sterilità si manifestava a livello sporofitico e cioè era provocata da difetti nello sviluppo dell'embrione e/o dell'endosperma nelle primissime fasi dello sviluppo. Considerando quindi che in *Paspalum PsORC3* si esprimeva principalmente nell'endosperma, si ritiene che tale gene possa avere un ruolo nello sviluppo dell'endosperma apomittico che in *Paspalum* differisce da quello sessuale per il rapporto dei genomi parentali che concorrono alla sua composizione. In particolare mentre nell'endosperma sessuale sono presenti 2 genomi materni e 1 paterno, in quello apomittico, poichè i nuclei polari non sono ridotti, il rapporto dei genomi è sbilanciato a favore dei genomi materni nel rapporto di 4m:1p. Tale rapporto comporta normalmente la degenerazione dell'endosperma e quindi la sterilità nei sessuali. *PsORC3* potrebbe essere quindi implicato nei meccanismi che regolano la "percezione" del corretto assetto dei genomi

parentali nell'endosperma e/o la degenerazione degli endospermi sbilanciati. L'ipotesi è quindi che tali endospermi si sviluppino nel *P.simplex* apomittico perché il gene *PsORC3*, deputato al controllo dello sviluppo degli endospermi bilanciati è silenziato in quest'organo. Se tale ipotesi potesse essere confermata, *PsORC3* potrebbe assumere un'importanza che travalica l'apomissia stessa. Infatti tale gene potrebbe essere uno dei geni chiave che inducono la degenerazione dell'endosperma e quindi la sterilità negli incroci tra parentali a diverso livello di ploidia.

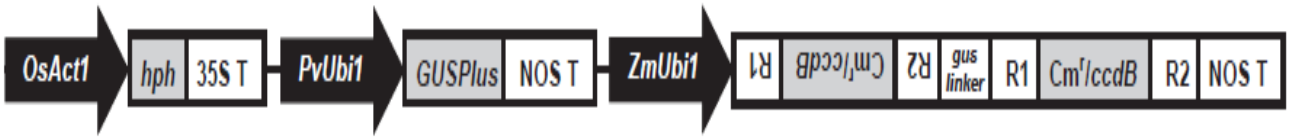
Per quanto riguarda lo studio strutturale e funzionale del trascritto n46 differenzialmente espresso tra fiori apomittici e sessuali di *P.notatum* e corrispondente al gene *MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE* (*PnMAP3K*), è stato condotto uno studio comparativo strutturale e funzionale dello stesso gene in *P.notatum* (Argentina), *P.simplex* (Italia) e *Brachiaria brizanta* (Brasile). L'analisi dell'espressione *in situ* (Argentina-Brasile) ha mostrato che l'RNA senso era sovraespresso negli ovuli immaturi e nelle antere degli apomittici mentre nei corrispondenti organi dei fiori sessuali era l'antisenso ad esprimersi ad alti livelli suggerendo che tale gene possa essere silenziato nei sessuali (situazione opposta al gene procedente che risultava essere silenziato negli apomittici). Piante apomittiche in cui il gene è stato disattivato mediante RNAi (Argentina), mostravano una parziale riduzione del numero dei sacchi embrionali non ridotti sul totale. Infine una copia del gene, duplicata in un trasposone, risultava co-segregare con l'apomissia sia in *P.notatum* che in *P.simplex* (Italia). Tali risultati indicavano che il gene oggetto di studio possa essere coinvolto nei meccanismi dell'aposporia, che nelle piante apomittiche inducono la formazione di sacchi embrionali a numero cromosomico somatico per differenziazione cellulare dal tessuto nucellare.

Attività 2017

Per verificare l'ipotesi, formulata l'anno precedente che il gene *PsORC3* possa essere implicato nei meccanismi di controllo dell'assetto dei genomi parentali nell'endosperma, si è pensato di disattivare tale gene mediante la tecnologia del RNAi, in genotipi sessuali tetraploidi di *P.simplex* per poi incrociarli con impollinatori diploidi e verificare lo sviluppo o meno di endospermi sbilanciati ad eccesso di genomi materni (4m:1p). Durante il corso del 2017 (Italia), è stato allestito il vettore di trasformazione del *P. simplex* per l'inattivazione del gene *PsORC3*. Operativamente, è stato utilizzato il vettore pANIC 7B (Figura1), che reca il gene *hph* per la

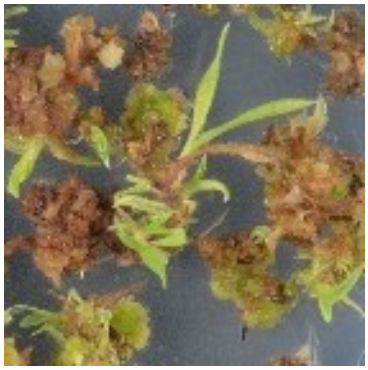
resistenza all'Igromicina B sotto il promotore del gene *Act1* di riso, il gene GUS, controllato dal promotore del gene *Ubt1* di *Panicum virgatum,* e la struttura deputata alla sintesi dell'hairpin (che reca un frammento del gene *PsORC3* in orientamento senso (S) e antisenso (AS) al posto della struttura RI e R2 nella figura 1) sotto il controllo del promotore del gene *Ubt1* di mais.

Figura 1



Tale struttura è stata disegnata per essere compatibile con il sistema di trasferimento genico Gateway. In breve la sequenza di *PsORC3* utilizzata in precedenza per gli esperimenti di ibridazione in situ è stata amplificata ed inserita nel "entry vector " pCR™8/GW/TOPO™ secondo la procedura indicata nel relativo kit TA cloning. Successivamente, il corretto plasmide ricombinante è stato selezionato dopo trasformazione di opportune cellule competenti ed utilizzato insieme alla LRclonase per trasferire la sequenza di *ORC3* in entrambi gli orientamenti senso e antisenso nel destination vector (pANIC 7B). Una volta verificata le presenza del gene nel vettore nell'orientamento corretto, lo stesso vettore (pANIC7B_*ORC3*S_AS) è stato usato per la trasformazione del *P. simplex* sessuale tetraploide mediante il sistema biolistico. Il protocollo di trasformazione (distanza e pressione di sparo e quantità di DNA da utilizzare) è stato ottimizzato monitorando l'espressione del gene GUS in tessuti fogliari e in calli di *P. simplex*. Una volta ottimizzati tali parametri, giovani calli indotti da sezioni di epicotili ottenuti da semi germogliati in vitro sono stati utilizzati per la trasformazione. Il vettore ricombinante pANIC 7B_*ORC3*S_AS è stato introdotto sia da solo che insieme al vettore pAHC25 che reca il gene BAR che conferisce la resistenza al Glufosinato di ammonio sotto il controllo del promotore del gene *Ubi1* di mais. Nel caso della co-trasformazione, la selezione dei calli trasformati è stata condotta sulla base della resistenza al Glufosinato di ammonio mentre l'Igromicina B è stata utilizzata per selezionare i calli trasformati con il solo vettore ricombinante. La dose ottimale degli agenti selettivi è stata stabilita sperimentalmente come la dose minima che impediva la rigenerazione del 100% dei calli non trasformati analizzati. Le linee cellulari risultanti dai vari esperimenti di trasformazione erano in corso di selezione nell'anno 2017 (Figura 2).

Figura 2



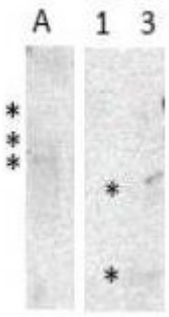
Inoltre nel corso dello stesso anno, per individuare trascritti differenzialmente espressi tra genotipi apomittici e sessuali nelle primissime fasi dello sviluppo del gametofito femminile, è stato messo a punto il sistema di isolamento dell'RNA da tessuti fiorali in via di sviluppo di linee apomittiche e sessuali di *Paspalum simplex* mediante la tecnologia del Laser Capture Microdissection (LCM) (Italia). In pratica sono state ottimizzate le metodologie che riguardano le modalità di inclusione degli abbozzi fiorali, lo spessore delle sezioni, il tipo di colorazione, l'intensità del raggio laser per la resezione del tessuto, il sistema di estrazione dell'RNA e la sua amplificazione lineare, la sintesi delle librerie a cDNA e il loro sequenziamento. I relativi dati sono attualmente in corso di elaborazione. Un sorta di verifica preliminare della robustezza degli stessi dati proviene dall' analisi comparativa della specificità di espressione di un gene di *P. notatum PN_LNC_N13* che esprime un RNA non codificante nei fiori di accessioni apomittiche e sessuali della stessa specie. Trascritti altamente omologhi a quelli di *P.notatum* sono stati rilevati nelle librerie di *P.simplex* confermando l'efficienza del metodo LCM nel rilevare trascritti espressi specificatamente nei fiori di *Paspalum* (Argentina).

<u>Attività 2018-2019</u>

Il progetto, inizialmente destinato a terminare il 31/12/2018 è stato prorogato, a parità di fondi, al 31/12/2019. Nel corso del 2017 sono state selezionate alcune linee cellulari di *Paspalum simplex* tetraploide sessuale resistenti, alcune (Hyg^+) all'Igromicina B e altre ($GluA^+$), al Glufosinato di ammonio, ottenute rispettivamente introducendo per via biolistica il plasmide pANIC 7B_*ORC3*S_AS sia da solo che insieme al plasmide pAHC25. L'obiettivo della ricerca era

quello di silenziare il gene *PsORC3* ritenuto implicato nei meccanismi di controllo del corretto assetto (2materno:1paterno) dei genomi parentali nell'endosperma del seme di questa specie. In particolare con l'esperimento suddetto si voleva verificare l'ipotesi che il silenziamento di tale gene permettesse lo sviluppo dell'endosperma caratterizzato da un eccesso di genomi materni (4m:1p) caratteristico dell'endosperma apomittico. Nel corso del 2018 (Italia) sono state rigenerate 30 piante appartenenti a tre linee cellulari Hyg^+ (A, B e C) e 4 piante $GluA^+$ (1A, 1B, 1D, 1E), ottenute mediante co-trasformazione dello stesso vettore insieme al vettore pAHC25. Delle linee Hyg^+ solo A e B recavano il gene per la resistenza e di queste solo le piante rigenerate dalla linea B recavano il frammento del gene *PsORC3* nell'orientamento senso e antisenso atteso. Le piante $GluA^+$, risultavano trasformate sia per il plasmide pAHC25 che per il plasmide pANIC 7B_*ORC3*S_AS che recava il frammento del gene *PsORC3* nell'orientamento atteso. Dall'analisi Southern delle piante rigenerate eseguita usando un frammento del gene *Gus* come sonda (Figura 3; è riportato un individuo rappresentativo per ciascuno dei due eventi di trasformazione), è risultato che le piante 1B-E, mostravano tre bande (*, Figura 3) di identico peso molecolare presumibilmente corrispondenti a tre eventi di inserzione indipendenti del vettore nel genoma (Fig. 3, corsia A) e le piante B mostravano tutte, due bande (Figura 3, corsia 3) corrispondenti a due eventi di inserzione.

Figura 3



In conclusione, sono state ottenute due popolazioni di 25 e 4 piante trasformate per la cassetta *ORC3*S_AS (senso-antisenso). Tali popolazioni erano costituite da individui identici tra loro per numero di inserzioni facendo presagire che tutti gli individui trasformati potessero essere riconducibili a due soli eventi di trasformazione indipendenti. L'analisi morfologica delle piante trasformate ha mostrato numerose differenze tra i due eventi di trasformazione e tra questi e le piante controllo non trasformate. In generale le piante Hyg^+ presentavano un severo ritardo dello

sviluppo vegetativo e non hanno fiorito durante il primo anno di acclimatamento in serra. Tra queste, le piante recanti la cassetta *ORC3*S_AS, mostravano un apparato radicale fortemente depresso e un portamento stolonifero della parte aerea. Viceversa le piante co-trasformate GluA$^+$, non presentavano differenze morfologiche significative rispetto ai controlli e sono andate in fioritura anche durante il primo anno (2018) di acclimatamento. Durante il secondo anno di acclimatamento le piante co-trasformate GluA$^+$ hanno fondamentalmente mantenuto il loro assetto morfologico mentre le trasformate Hyg$^+$ hanno mostrato un parziale cambiamento della parte area dal fenotipo "prostrato" ad "eretto" e quest' ultimo ha mostrato una fioritura apparentemente normale. Sono stati quindi eseguiti gli incroci corrispondenti secondo la tabella sotto riportata.

Tabella 1. Incroci effettuati nel biennio 2018-2019

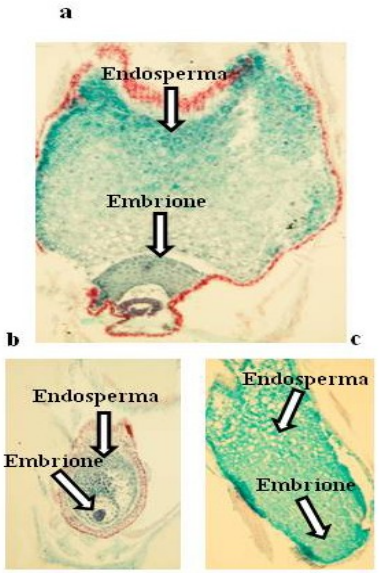
Anno 2018		
Tipi di incroci		
PsORC3$^-$ 4nSex* X WT 2nSex§		
♀	N.incroci	N.semi
1B[1]	235	4
1C[1]	180	-
1D[1]	209	-
1E[1]	303	3

Anno 2019								
Tipi di incroci								
PsORC3$^-$ 4nSex X WT 2nSex			PsORC3$^-$ 4nSex X WT 4nSex			WT 4nSex° X WT 2nSex		
♀	N.incroci	N.semi	♀	N.incroci	N.semi	♀	N.incroci	N.semi
1B	37	-	1E	158	2	53(E)	167	-
1D	337	2				5(N)	289	-
1E	267	7						
B7[2]	167	2						
B10[2]	122	-						

Legenda: * = Pianta sessuale tetraploide trasformata per *PsORC3S-AS*; § = Pianta sessuale diploide non trasformata; ° = Pianta sessuale tetraploide non trasformata; [1] = pianta co-trasformata; [2] = pianta trasformata.

Considerando che, come atteso e come riportato in letteratura, nessun seme è stato ottenuto a partire da parentali a diverso livello di ploidia (WT 4nSex X WT 2nSex), che comporterebbe la formazione e sviluppo di un endosperma con un eccesso di genomi materni (4m:1p), è stata intrapresa un'analisi istologica dei semi con l'obiettivo di individuare lo stadio e i tessuti interessati all'arresto dello sviluppo.

Figura 4



Tetraploide sessuale X tetraploide (sessuale e/o apomittico): assetto atteso dei genomi parentali nell'endosperma 2m:1p

Tetraploide sessuale X diploide: Assetto atteso dei genomi parentali nell'endosperma 4m:1p

Sino a 2-3 giorni dopo la fecondazione (GDF), lo sviluppo dell'embrione e dell'endosperma non presenta differenze significative tra ovari derivanti da incroci eseguiti tra parentali a pari livelli di ploidia (endosperma bilanciato 2m:1p), e quelli ottenuti incrociando tetraploidi come portaseme (madri) con diploidi come impollinatori (endosperma con eccesso materno; 4m:1p). Contrariamente a ciò, mentre lo sviluppo dei semi con endospermi bilanciati 2m:1p, rilevato 5 GDF, è risultato regolare con embrione ben definito ed endosperma già allo stadio di moltiplicazione cellulare (Fig.4a), nel caso degli endospermi sbilanciati 4m:1p, lo sviluppo degli stessi organi è notevolmente ritardato (Fig.4b). Questo significa che l'eccesso di genomi materni nell'endosperma comporta l'arresto dello sviluppo dello stesso allo stadio di cellularizzazione impedendo così l'ingresso alle fasi successive che prevedono un breve ciclo di mitosi seguite da molteplici cicli di endoreduplicazione del DNA non seguiti da conseguenti divisioni cellulari. Per verificare se la presenza della cassetta *ORC3*S-AS influisce sul superamento dell'arresto dello sviluppo dell'endosperma con eccesso di genomi materni, è stata eseguita un'analisi istologica comparativa 5 GDF, di fiori di genotipi trasformati tetraploidi impollinati da parentali diploidi i cui risultati dimostrano che una percentuale intorno al 10% di tali fiori danno luogo a endospermi ed embrioni regolarmente sviluppati (Fig.4c) che successivamente danno luogo a semi apparentemente vitali (pieni).

Il passo successivo è costituito dalla verifica sperimentale dell'effettivo assetto genomico dell'endosperma e dell'embrione dei semi derivanti dall'incrocio della pianta trasformata X diploide e relativi controlli. Per questo scopo i pochi semi ottenuti sono stati analizzati in Argentina mediante la tecnologia della citometria a flusso che permette di risalire al grado di ploidia delle diverse strutture che compongono il seme sulla base del contenuto di DNA dei nuclei dei tessuti che li compongono. Dal profilo corrispondente ai semi dei controlli tetraploidi sessuali risultano 4 picchi di emissione che corrispondono a: (a) embrione 4x fase G (fase mitotica, 4C), (b) endosperma 6x in fase G (6C), (c) embrione 8x in fase S (replicazione del DNA, 8C), (d) endosperma 12x in fase S (12C). Il rapporto genomico tra embrione ed endosperma nel sessuale è quindi 2(4x, embrione):3(6x, endosperma). Il profilo del controllo tetraploide apomittico ha generato tre picchi di emissione che corrispondono a: (a) embrione 4x fase G (4C), (b) endosperma 10x in fase G (10C), (c) embrione 8x in fase S 8C, (d); la fase S dell'endosperma non è identificabile e il rapporto genomico embrione:endosperma è quindi 2:5. Per quanto riguarda i semi derivati da incrocio, l'intepretazione più plausibile dei picchi ottenuti è la seguente: (a) embrione 3x in fase G, (b) endosperma 5x in fase G, (c) embrione 6x in fase S, (d) endosperma 10x in fase S. Il rapporto genomico tra embrione ed endosperma è quindi 3(embrione):5(endosperma). Quindi sia il contenuto di DNA dell'endosperma (2x + 2x(materno)+1x(paterno)) che il rapporto genomico 3:5 embrione : endosperma, indicano che tali semi sono composti da embrioni triploidi e endospermi pentaploidi con un eccesso di genomi materni (4m:1p). Tale profilo non può essere attribuito a nessuno dei possibili fenotipi alternativi (2embrione:3endosperma) derivanti sia da autofecondazione che da incrocio della pianta trasformata tetraploide con genotipi tetraploidi (sia apomittici che sessuali). In totale, dei 7 semi ottenuti, 5 hanno mostrato il fenotipo triploide, mentre gli altri due hanno mostrato un profilo difficilmente interpretabile e non attribuibile ad alcuno dei modelli attesi. In conclusione dall'analisi citofotometrica a flusso sembra che la pianta trasformata per la cassetta *ORC3*S-AS, sia in grado, anche se con una bassa efficienza, di generare individui triploidi con un endosperma sbilanciato. Per confermare tale dato, nel corso del 2019 sono stati ripetuti gli incroci (Italia) aggiungendo due controlli sex 4n (non trasformata) X sex 2n e un controllo sex 4n (trasformata) X sex 4n (Tabella 1). Dagli incroci derivanti dalla pianta co-trasformata X diploide sono stati ottenuti 9 semi e dalla pianta trasformata X diploide 2 semi. Il controllo pianta trasformata X sessuale 4n ha generato due semi mentre nessun seme è stato ottenuto dagli incroci pianta controllo tetraploide non trasformata X diploide sessuale come atteso. I

semi ottenuti sono stati portati in Argentina per ripetere l'analisi citofotometrica che è attualmente in corso.

Resta tuttora da verificare il fatto che la presenza della cassetta *ORC3*S-AS possa effettivamente silenziare (anche parzialmente) il gene endogeno nella pianta trasformata e utilizzata negli incroci che hanno generato individui triploidi con endosperma con eccesso di genomi materni. Tale verifica è attualmente in corso utilizzando la tecnica della TaqMan RT-qPCR che permette di quantificare l'espressione relativa di uno specifico allele. Qualora il silenziamento del gene endogeno fosse confermato, e i semi ottenuti nel corso del 2019 fossero essi stessi triploidi con endosperma sbilanciato, allora avremmo la conferma che il gene ORC3 in *P. simplex* apomittico è implicato nello sviluppo dell'endosperma caratterizzato da un eccesso di genomi materni.

Infine, sempre nel corso del biennio 2018-2019, è stato completato uno studio che ha permesso di identificare porzioni cromosomiche localizzate in posizioni telomeriche dei cromosomi 12, 8, 3 e 4 rispettivamente di riso, sorgo, *Setaria italica* e *Brachypodium distachyum*, e in una posizione più centromerica del cromosoma 1 di mais dove sono localizzati gli omologhi di alcuni geni localizzati nel locus che controlla l'apomissia in *P. simplex* (Italia). Tali porzioni cromosomiche, si sono rivelate instabili dando luogo a fenomeni di duplicazione, inversione e traslocazione nel corso dell'evoluzione delle graminacee. Inoltre da un'analisi dell'espressione di tali geni (Argentina) è stato visto che essi si esprimono tutti nelle strutture riproduttive del fiore e nello stesso modo (es, come senso e antisenso). Queste due osservazioni fanno presagire che nelle graminacee l'evoluzione di una porzione instabile del genoma ha fatto sì che in certe situazioni, alcuni geni responsabili dello sviluppo sessuale venissero ad essere localizzati nello stesso intorno genetico causando da un lato il blocco della ricombinazione poichè le porzioni cromosomiche ricombinate non trovano più un regione omologa con cui appaiarsi, e dall'altro un riarrangiamento delle loro regioni regolatrici per cui questi geni si esprimono in una maniera coordinata simile agli operoni procariotici.

I risultati del progetto oltre a costituire l'oggetto delle pubblicazioni congiunte "peer review" sotto elencate, aprono nuove opportunità per l'isolamento dei determinanti genetici dell'apomissia e, in prospettiva, per la sua introgressione nelle graminacee di interesse agrario. In particolare l'isolamento e caratterizzazione del gene *PsORC3* oltre che contribuire all'introduzione dell'apomissia nelle specie di interesse agrario (tutte o quasi legate al fatto che i semi si sviluppano solo quando il rapporto dei genomi parentali nell'endosperma è 2m:1p), apre la strada alla possibilità di superare le barriere di incompatibilità post-zigotica, che si osserva frequentemente negli incroci tra parentali a diverso livello di ploidia allargando così il pool genico a disposizione per il miglioramento genetico delle specie agrarie.

Le ricadute occupazionali dei risultati della presente ricerca potranno essere apprezzati nel medio/lungo termine quando lo sviluppo della tecnologia apomittica permetterà ai coltivatori delle aree più svantaggiate di affrancarsi dalla dipendenza delle multinazionali sementiere per la produzione di seme ibrido. Il progetto ha contribuito a consolidare ulteriormente i rapporti costruttivi di collaborazione scientifica che si sono instaurati negli anni tra le istituzione partecipanti e ha posto le basi per la costituzione di un network Europeo di interscambio di ricercatori sul tema dell'apomissia che è stato recentemente finanziato nel quadro del programma H2020-MSCA-RISE-2019 (Progetto: Mechanisms of Apomictic Development, MAD No 872417) in cui sia l'IBBR-CNR che l' IICAR-CONICET costituiscono parte integrante.

Pubblicazioni (* identifica gli autori argentini):

1) Lorena A. Siena*, Juan Pablo A. Ortiz*, Ornella Calderini, Francesco Paolocci, Maria E. Cáceres, Pankaj Kaushal, S. Grisan, Silvina C. Pessino*, **Fulvio Pupilli**. An apomixis-linked *ORC3*-like pseudogene is associated with silencing of its functional homolog in apomictic *Paspalum simplex* (2016) Journal of Experimental Botany 67:1965-1978.

2) Ana Ochogavía*, Giulio Galla, José Guillermo Seijo*, Ana María González*, Michele Bellucci, **Fulvio Pupilli**, Gianni Barcaccia, Emidio Albertini, Silvina Claudia Pessino*. Structure, target-specificity and expression of *PN_LNC_N13* a long non coding RNA differentially expressed in apomictic and sexual *Paspalum notatum* (2018) Plant Molecular Biology 96: 53-67.

3) Micaela Mancini*, Hugo Permingeat*, Carolina Colono*, Lorena Siena*, **Fulvio Pupilli**, Celeste Azzaro*, Diva Maria de Alencar Dusi, Vera Tavares de Campos Carneiro, Maricel Podio*, José Guillermo Seijo*, Ana María González*, Silvina A. Felitti*, Juan Pablo A. Ortiz*, Olivier Leblanc and Silvina C. Pessino*. The MAP3K-Coding QUI-GON JINN (QGJ) gene is essential to the formation of unreduced embryo sacs in *Paspalum* (2018) Frontiers in Plant Science 9: 1547.

4) Giulio Galla, Lorena A. Siena*, Juan Pablo A. Ortiz*, Helmut Baumlein, Gianni Barcaccia, Silvina C. Pessino*, Michele Bellucci & **Fulvio Pupilli**. A portion of the apomixis locus of *Paspalum simplex* is microsyntenic with an unstable chromosome segment highly conserved among Poaceae. (2019) Scientific Reports 9: 3271.

Perugia 29/Gennaio/2019

Il Responsabile scientifico del progetto

Dr. Fulvio Pupilli

PUPILLI
FULVIO
31.01
.2020
11:57:39
UTC